

気節-非相分離振幅変調多重化  
フロー分析法の開発と  
リン酸イオン定量への応用

2015

大楠 剛司

# 目次

## 第 1 章 序論

1.1	研究の背景	4
1.1.1	フロー分析法の開発	
1.1.2	フロー分析法の特徴・利点	
1.2	振幅変調多重化フロー分析法の原理と特徴	6
1.2.1	振幅変調多重化フロー分析法（AMMFA）の原理	
1.2.2	AMMFA のシステム	
1.2.3	AMMFA の特徴	
1.3	リン	8
1.4	本研究の目的	8

## 第 2 章 振幅変調 - ロックイン検出フロー分析法／

### マラカイトグリーン法によるリン酸イオンの定量

2.1	緒言	9
2.2	実験	9
2.2.1	分析システム	
2.2.2	プログラムの基本原理	
2.2.3	マラカイトグリーン法	
2.2.4	試薬および試料	
2.3	結果と考察	13
2.3.1	分析波長の検討	
2.3.2	反応温度の検討	
2.3.3	制御信号周期の検討	
2.3.4	分析性能	
2.3.5	ベースライン変動の影響	
2.3.6	共存イオンの影響	
2.3.7	実試料分析への応用	

<b>第 3 章</b>	<b>気節 - 非相分離／振幅変調多重化フロー分析法による高感度定量</b>	
3.1	緒言	20
3.2	空気分節	21
3.3	実験	22
	3.3.1 分析システム	
	3.3.2 試薬および試料	
	3.3.3 AMMFA プログラムの基本原理	
	3.3.4 信号処理による気泡シグナルの除去と平滑化	
3.4	結果と考察	28
	3.4.1 信号処理による相認識の最適化	
	3.4.2 気節 - 非相分離振幅変調フロー分析法（単一試料の分析）	
	3.4.3 気節 - 非相分離振幅変調多重化フロー分析法（2 試料同時分析）	
	3.4.4 実試料分析への応用	
<b>第 4 章</b>	<b>内標準 - 振幅変調フロー分析法</b>	
4.1	緒言	38
4.2	実験	39
	4.2.1 分析システム	
	4.2.2 試薬および試料	
4.3	結果と考察	41
	4.3.1 内標準物質の選択	
	4.3.2 フェナントロリン吸光光度法による鉄（Fe <sup>2+</sup> ）の定量	
	4.4.3 試料流量のゆらぎに対する頑健性	
<b>第 5 章</b>	<b>総括</b>	45

謝辭	46
----	----

参考文献	47
------	----

# 第 1 章 序論

## 1.1 研究の背景

### 1.1.1 フロー分析法の開発

薬学，医学，環境科学，工学などの分野では，多数のそしてしばしば危険な試料の分析が求められる。したがって，試料の注入，試薬との混合・反応，検出，解析，表示などさまざまな過程からなる分析操作を準閉鎖系・流れ系内で自動化することは，効率化，精度向上，安全性向上，省力化のために重要である。

フロー分析法（流れ分析法）は，自動連続分析法ともよばれ，流体の流れを利用した自動分析法である。フロー分析法の原点は，Skeggs[1,2]により報告された気節分析法 segmented flow analysis (SFA) である。この方法の特徴は，流れ系内で試料（液体）に空気を導入し，その気節によって試料を細かいセグメントに分節する点にある。各セグメントは，伝統的なバッチ分析法における個々の容器に対応するとみなすことができる。このセグメント内で試料と試薬の混合と反応が促進され，さらに気節によって試料間の相互汚染，すなわちキャリアオーバーを防ぐこともできる。しかし，この方法には空気の圧縮性による脈動の発生，気節由来ノイズを防ぐために検出器直前に気液分離（脱気）過程を導入することによるシステムの複雑化などの問題点があった。1975 年に Ruzicka と Hansen によって報告されたフローインジェクション分析法 flow injection analysis (FIA) [3] は，空気分節を伴わないフロー分析法で，不活性のキャリアー溶液の中に一定微量の試料を次々と注入し，一連の流れの中で試薬との混合・反応を行ない，下流で検出する方法である。比較的安価なチューブやポンプなどを用いて容易にシステムを構築することができ，高い効率・精度を得ることができる。その後，シーケンシャルインジェクション分析法 sequential injection analysis (SIA) [4]，ビーズインジェクション分析法 beads injection analysis (BIA) [5]，ラボ・オン・バルブ法 lab-on-valve system (LOV) [6]，マルチシリンジ FIA multi-syringe flow injection analysis (MSFIA) [7,8]，マルチポンピング分析 multi-pumping analysis (MPA) [9,10]，オールインジェクション分析法 all-injection analysis (AIA) [11]，フィードバック制御フローレイシオメトリー feedback-based flow ratiometry [12]など，FIA の発展型とも言えるさまざまな分析法や新規原理に基づくフロー分析法が開発され，多くの成書[13-22]も刊行された。現在では，フローインジェクション分析講演会などの国内学会，International Conference on Flow Injection Analysis や Flow Analysis などの国際会議を通じて活発的な学術交流が行われ，年間 1000 報を超える論文が公表されている[23-26]。

日本では，1989 年に JIS K 0126「フローインジェクション分析方法通則」が制定され，2009 年に JIS K 0126「流れ分析通則」へと改訂された[27]。2011 年 3 月には，JIS K 0170:「流れ分析による水質試験法」が制定され，アンモニア体窒素，亜硝酸体窒素及び硝酸体窒

素，全窒素，りん酸イオン及び全りん，フェノール類，ふっ素化合物，クロム（VI），陰イオン界面活性剤，シアン化合物の 9 項目が規格化された[28]。これを受け，2013 年に JIS K 0102「工場排水試験方法」が改正され，JIS K 0170「流れ分析法による水質試験方法」が追加された[29]。さらに，2014 年に流れ分析法が K0102 の一部として公定法として採用された。

### 1.1.2 フロー分析法の特徴・利点

一般的なフロー分析法の特徴・長所として，次の (1)～(6) などがあげられる。

- (1) Ruzicka らの最初の報告[3]では 1 時間あたり 150 ～ 200 試料の測定を行っている。試料処理速度は反応系や検出法など実験条件により異なるが，1 時間あたり 30 ～ 60 試料が一般的である。これはバッチ法に比べはるかに効率的である。
- (2) 操作は簡便であり，一旦，送液ポンプ，インジェクションバルブ，反応コイル，検出器などからなるシステムを構築すれば，試料や試薬を送液するだけでよく，オートサンプラーも使用できる。さらに，コンピュータ制御により自動無人測定も可能である。
- (3) 一回の測定あたりに必要な試料や試薬の量はバッチ分析法に比べ大幅に少なくてよく，このため廃液量も大幅に低減することができる。
- (4) 多様な前処理操作（カラム処理，溶媒抽出，気体透過，紫外線照射など）をシステムに組み込むことができ，高機能化することが可能である。
- (5) 細管内準閉鎖系で一連の分析過程が実行されるため，試料や試薬からの実験環境汚染あるいは実験環境から試料へのコンタミネーションは非常に少ない。
- (6) 安定した送液が確保される限り，試料の導入，試薬との混合，検出などのタイミングが精密に制御でき，さらに手分析とは異なって疲労を感じることもないので，高い精度の測定が行える。精度はコンピュータ制御によりさらに高めることができる。

## 1.2 振幅変調多重化フロー分析法の原理と特徴

### 1.2.1 振幅変調多重化フロー分析法（AMMFA）の原理

振幅変調多重化フロー分析法 amplitude modulated multiplexed flow analysis (AMMFA) は、フロー分析法に周波数解析の概念を導入した多成分同時定量法である[30]。複数の試料流量を互いに周波数の異なる周期信号によって制御することで、試料中の目的成分の情報（濃度など）が振幅変調される。変調された情報は液の合流によって多重化される。下流で得られる分析シグナルは各試料流量の変動を反映した複雑な形状となるが、ロックイン検出や高速フーリエ変換 fast Fourier transform (FFT) のような周波数解析を行うことで、各周波数成分の振幅へと復調することができる[30-33]。この原理に基づくと、多情報を 1 つのフローシステムに送り、1 種類の信号からそれぞれを同時に求めることができる。周波数が異なる制御信号の数を増やすほど、これに応じた数の試料あるいは成分を同時測定することが可能である。

従来のフロー分析法で多成分同時定量を行う場合には、フロー系内への分離過程（ミニカラムなど）の導入や、複数の流路への分割または複数の検出器からの信号取得（多チャンネル化）が一般的であった。しかし、必然的にこれらのシステムは複雑となり、分析コストの増大やトラブル発生頻度の上昇などの短所を伴う。AMMFA では、分離過程がなく、検出器は 1 つのみの、単純かつ経済的なシステムで多成分同時定量が可能である。

### 1.2.2 AMMFA のシステム

AMMFA の基本的な流路構成を図 1.1 に示す。フロー系内に導入する複数の試料 ( $S_1$  及び  $S_2$ ) の流量を、信号発生器 SG から供給される周波数の異なる複数の制御信号 ( $V_{c1}$  及び  $V_{c2}$ ) によって変動させる。これによって各試料の情報を変調する。試薬 R との合流後、反応コイル RC を用いて混合・反応を促進させた後、下流の検出器 D で測定する。検出信号  $V_d$  をアナログ／デジタル交換器によってデジタル化したのち、コンピュータ PC に取得する。これを周波数解析（ロックイン検出あるいは FFT）して  $V_{c1}$  及び  $V_{c2}$  に対応する周波数成分の振幅を求め、それぞれの振幅から  $S_1$  及び  $S_2$  中の目的成分の定量を行う。周波数解析を行う窓を時間と共に前方へと移動させることで、リアルタイムでの解析が可能である。

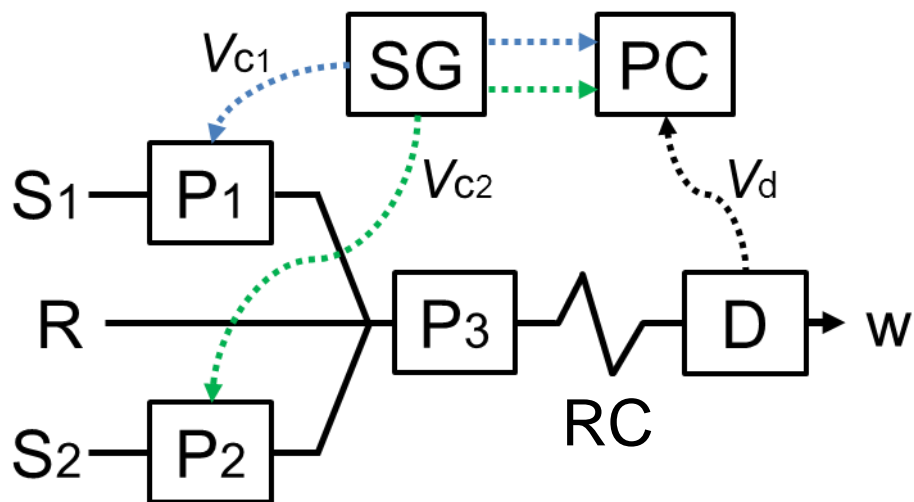


図 1.1 振幅変調多重化フロー分析法の流路構成

### 1.2.3 AMMFA の特徴

- (1) フロー分析法に，情報の振幅変調や多重化，周波数解析による復調といった通信工学の手法を導入した新規でユニークな分析法である。
- (2) コンピュータの利用により，一連の分析過程（制御，計測，解析，表示）の自動化が可能である。
- (3) 比較的単純なシステム構成で，多試料・多成分の同時分析が行える。
- (4) 経済性かつ汎用性があり，さまざまな検出法との組み合わせが可能である。



## 1.3 リン

リンは生体にとって必要不可欠であり、自然環境中に遍在する元素である。リン化合物は、肥料、殺虫剤、機能材料（センサー、触媒、人工骨）など、広範囲にわたって利用されている。また、水圏における富栄養化を引き起こすことがあり、生態系の破壊につながることもある。その一方で、リン資源（リン灰石など）は近い将来枯渇することが危惧されている[34]。このような背景のもと、自然界のリンサイクルを把握するために、信頼性の高いリン定量法の開発が強く求められている。

環境中において、リンは溶存反応性リン（リン酸イオン）、溶存縮合リン、溶存有機リンなど様々な形で存在している[35]。リン酸の定量法としては、吸光光度法[36-39]、蛍光光度法[40,41]、化学発光分析[42,43]、誘導結合プラズマ発光分析法[44]、ポテンショメトリー[45]、ボルタンメトリーおよびアンペロメトリー[46]など、多数報告されている[35,47-49]。これらのうち最も一般的な吸光光度法でリン酸イオンを定量する場合、呈色反応に先立って各種化学形態のリンをリン酸イオンへと変換する煩雑で時間を要する前処理が必要である[50,51]。

## 1.4 本研究の目的

本研究室のこれまでの研究[30, 31]では、振幅変調多重化フロー分析法（AMMFA）を提案し、そのシステムを構築して $\sigma$ -フェナントロリン法による $\text{Fe}^{2+}$ の定量やチオシアン酸水銀法によるハロゲン化物イオンの定量へと応用した。これらの研究により、AMMFAの原理の妥当性が示された。本研究では、AMMFAをさらに発展させた気節 - 非相分離 AMMFAを開発し、リン酸イオンの高感度定量へと応用した。まず、リン酸イオンの呈色反応として一般的なモリブデンブルー法よりも高感度なマラカイトグリーン（MG）法を、周波数解析法としてロックイン検出法をそれぞれ採用し、フロー分析システムの構築と基本的分析条件の最適化を行った。分析性能を評価し、共存物質の影響について検討した後、実試料（河川水）の分析へと応用した。次に、さらなる高感度化と多重化による多試料同時分析をめざして気節 - 非相分離 AMMFAを開発した。すなわち、AMMFAに空気分節法を導入し、試料分散による振幅減衰を抑制し高感度化をはかると共に、周波数解析法として高速フーリエ変換 FFTを採用し、2試料同時分析へと発展させた。空気分節法の導入にあたっては、物理的脱気を行わず、自作プログラムを用いる信号処理によって気節由来信号を除去した。構築したシステムの分析性能を評価したのち、実試料の分析へと応用し、本分析法の検証を行った。

最後に、長時間連続分析における AMMFA の頑健性の向上を目指し、内標準法を導入した AMMFA も提案した。

## 第2章 振幅変調 - ロックイン検出フロー分析法／マラカイトグリーン法によるリン酸イオンの定量

### 2.1 緒言

本章では、振幅変調フロー分析法 (AMFA) に、公定法[29,52]として用いられるモリブデンブルー法よりも反応が迅速で高感度 (バッチ法での定量範囲 :  $0.000129 \sim 0.006457 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) であることが報告[53,54]されているマラカイトグリーン (MG) 法の適用を検討した。マラカイトグリーン法は、呈色物質が光学セル窓などに吸着されやすく、正の誤差を与えるため、フロー分析ではこれまであまり用いられなかった。周波数解析にはロックイン検出法を採用した。

### 2.2 実験

#### 2.2.1 分析システム

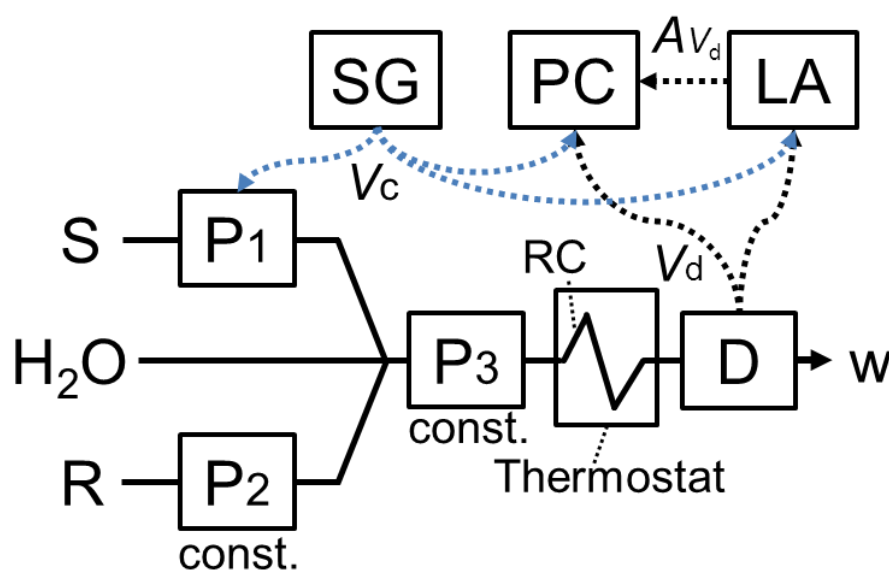


図 2.1 振幅変調 - ロックイン検出フロー分析法の流路構成

振幅変調 - ロックイン検出フロー分析システムの流路構成を図 2.1 に示す。流路を構成する細管には、PTFE チューブ（内径 0.5 mm）を用いた。送液ポンプ  $P_1 \sim P_3$  には、流量可変ポンプ（Rainin, Dynamax RP-1）を使用した。 $P_1$  及び  $P_2$  では内径 0.51 mm のファームドチューブを、 $P_3$  では内径 0.79 mm の同チューブをそれぞれ使用した。 $P_1$  によって送液される試料溶液 S の流量は、信号発生器 SG（エヌエフ回路設計ブロック，マルチファンクションジェネレータ WF1974）から発せられる制御信号  $V_c$  に応じて変化する。 $P_1$  の単位電圧あたりの流量は、約  $0.25 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1} \text{ V}^{-1}$  である。 $P_2$  によって送液される試薬溶液の流量は  $0.6 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$  で一定である。合流点において、両液は第 3 の流路から受動的に吸引される希釈液である水と合流する。下流の  $P_3$  で、全流量を一定 ( $1.2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ ) に保っているため、水の流量は、(全流量) - (試料と試薬の流量の和) で表わされる。総流量を一定に保持する理由は、液の合流から紫外可視分光検出器 D（相馬光学，S3250 型）による測定までの遅延時間（lag time）を一定に保持するためである。この時間は、合流点から検出器内のフローセル（相馬光学，石英製，光路長 5 mm）までの混合溶液の輸送時間にほぼ等しい（検出器の応答時間も僅かに含まれる）。下流の温度調節器 Thermostat（温度センサー（TOP L-TN-4PT100），ヒーター（TOP 5099-01， $100 \times 25 \text{ mm}$ ），PID 温度調節器（Toho BX303）の 3 つの部品から構成される）で加温された反応コイル RC（内径 0.5 mm，長さ 50 cm）によって混合液の呈色反応が促進される（滞留時間：4.9 s）。この吸光度（相対値）を上記検出器によって測定する。検出信号  $V_d$  をロックインアンプ LA（エヌエフ回路設計ブロック社，LI-5640 型）で周波数解析することで、試料濃度に対応する周波数成分の振幅  $A_{vd}$  が得られる。得られた  $A_{vd}$  はカード型 A/D-D/A コンバータ（Measurement Computing 社，PC-CARD-DAS16/12-A/O）を通してデジタル化され、Microsoft Excel 形式でラップトップ型コンピュータ PC（東芝，Dynabook Satellite 1850 SA120C/4）内に保存される。

ロックイン検出は、複数の周波数成分から構成される信号の中から特定の周波数の信号を検出し、その振幅を求める方法である。検出信号  $V_d$  には、試料成分に対応する周波数の信号だけでなく、さまざまな要因で発生する雑音由来の信号などが含まれている。ロックインアンプは、目的周波数付近の狭い範囲（帯域幅）での計測を行い、目的信号を減衰させることなく、ノイズの影響を大幅に軽減させることが可能である。目的信号の周波数は制御信号  $V_c$  の周波数に等しいため、信号発生器 SG からロックインアンプ LA に  $V_c$  を参照信号として入力した。検出信号  $V_d$  からこの参照信号と同じ周波数を持つ成分を抽出し、その振幅  $A_{vd}$  を得た。

## 2.2.2 プログラムの基本原理

表 2.1 に主要な制御計測パラメータとその設定値の一例を示す。この場合、試料溶液 S の流量を制御する制御信号  $V_c$  は周期 (Period) 30 s, 振幅 (ピーク間電圧) 2 V の交流波形信号である。また、この条件のもとで得られたフローシグナルの実例を図 2.2 に示す。制御信号  $V_c$ , 紫外可視分光検出器から得られる検出信号  $V_d$ , ロックイン検出器によって求められた振幅  $A_{vd}$  ( $V_d$  のうち,  $V_c$  と同じ周波数成分の振幅) がリアルタイムでカラー表示されるようプログラムされている。この場合,  $A_{vd}$  は試料中のリン酸イオンの濃度に対応している。図 2.2 より, 振幅変調によって  $V_d$  の値は変化してもその振幅  $A_{vd}$  は一定であることがわかる。

表 2.1 制御計測パラメータ

Collect time / min (測定時間)	1.5
Sampling Frequency / Hz (サンプリング頻度)	10
$V_c$ Peak voltage, high / V (制御信号 $V_c$ の上限, 極大値)	2
$V_c$ Peak voltage, low / V (制御信号 $V_c$ の下限, 極小値)	0
$V_c$ Period / s (制御信号 $V_c$ の周期)	30

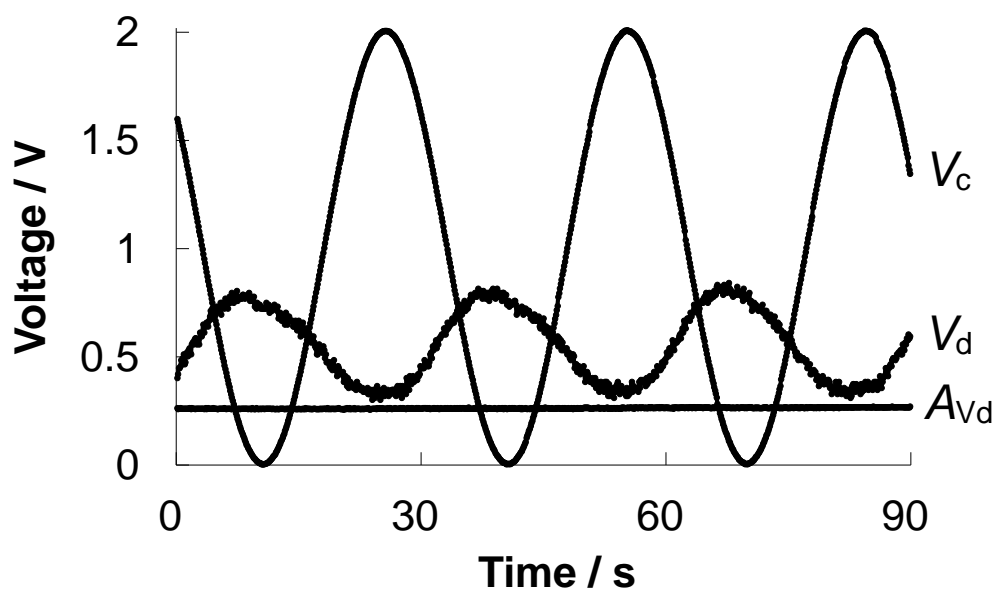
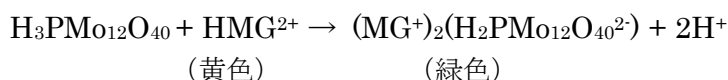


図 2.2 フローシグナル

※ 試料 : 0.060 mmol dm<sup>-3</sup> リン酸イオン溶液

### 2.2.3 マラカイトグリーン法

マラカイトグリーン法は、酸性溶液中で、リン酸イオンとモリブデン酸アンモニウムとの反応で生成するモリブドリン酸（3 価の陰イオン）と、1 価陽イオン状態にあるマラカイトグリーン(MG<sup>+</sup>)を会合させる呈色反応である[51]。この会合の間に MG<sup>+</sup>は黄色から緑色へと変化し、イオン会合体のモル吸光係数 ( $\epsilon$ ) は  $8 \sim 9 \times 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  に達する。



一方で、生成するイオン会合体は疎水性が高いために沈殿しやすく、フロー系の流路内（テフロン配管、フローセルなど）に沈着して正の誤差を与えることが指摘されている。この対策として、本研究では反応試薬に分散剤としてポリビニルアルコール PVA（重合度 1700）を加え、生成物の沈殿・吸着を抑制した。PVA には呈色を安定させる作用もあるため、検出感度の上昇も期待できる[54]。

### 2.2.4 試薬および試料

実験に使用した試薬は関東化学, ナカライテスク, 和光純薬工業より購入した特級試薬で、さらなる精製を行わずに用いた。試料溶液としてリン酸二水素カリウムを水に溶かし、リン酸イオン溶液とした。モリブデン酸アンモニウム, マラカイトグリーン, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> およびポリビニルアルコールをそれぞれ  $0.11 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $1.26 \text{ mol dm}^{-3}$  および 0.05% 含む水溶液を調製し、呈色試薬溶液とした。調製に使用した水（溶媒）は、逆浸透水をザルトリウス社製アリウム 611DI 型超純水製造装置により精製したものである。実試料として、吉野川の第十堰（板野町）、吉野川感潮域の名田橋（藍住町）、そして鮎喰川の梁瀬橋（徳島市）の 3 箇所付近で河川水試料を採取した。これら試料を平均孔径  $0.45 \mu\text{m}$  の使い捨てディスクフィルター（関東化学）によりそれぞれろ過し、ろ液をポリプロピレン容器中で冷蔵保存（4℃）した。

## 2.3 結果と考察

### 2.3.1 分析波長の検討

モリブドリン酸とマラカイトグリーンの緑色イオン対の吸収スペクトルをバッチ法により波長 550～750 nm の範囲で測定した。極大吸収波長 625 nm を以降の実験における分析波長とした。

### 2.3.2 反応温度の検討

マラカイトグリーン法の呈色反応は迅速であるが、さらに反応を促進させるために加温を行った。 $15.5 \mu\text{mol dm}^{-3}$  リン酸イオン溶液の測定を行い、反応温度と分析シグナル(振幅  $A_{\text{vd}}$ )との関係を検討した。検討した反応温度は、25, 40, 50, 60℃である。

図 2.3 に、反応温度と  $A_{\text{vd}}$  との関係を示す。反応温度と共に  $A_{\text{vd}}$  も上昇し、50℃において極大値となった。温度 60℃では、 $A_{\text{vd}}$  は若干減少し、細管内には気泡の発生が見られた。以上の結果より、50℃を最適反応温度と決定した。

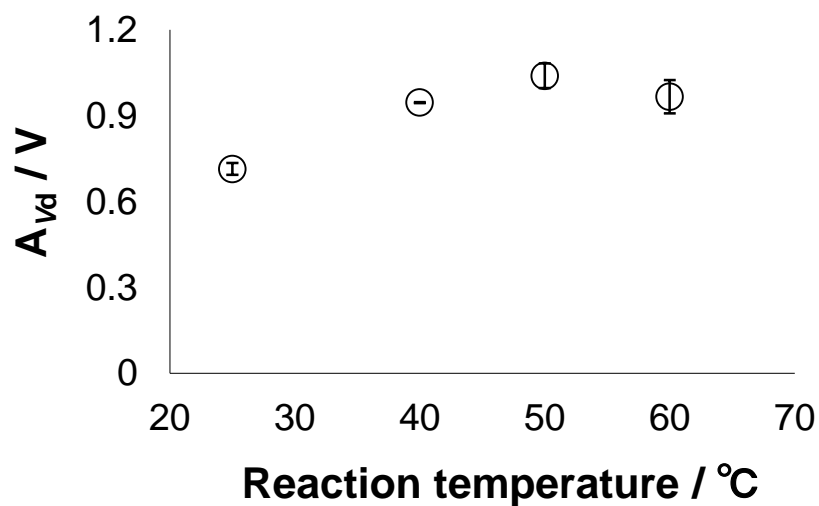


図 2.3 反応温度と振幅との関係

### 2.3.3 制御信号周期の検討

試料溶液 S として  $2.9 \mu\text{mol dm}^{-3}$  のリン酸イオン溶液をポンプ  $P_1$  で送液した。このポンプを交流波形制御信号  $V_c$  によって制御し、最大流量が  $0.5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ 、最小流量が  $0 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$  となるようにした。検討した  $P_1$  の制御周期は 5, 10, 15, 20, 30 s である。

図 2.4 に、制御信号周期と振幅  $A_{vd}$  との関係を示す。周期と共に  $A_{vd}$  も増加し、15 s 以上の周期においてプラトーに達した。流路内でのリン酸イオン濃度の濃度勾配が急激になると、検出器が流れの中の微小領域の情報に対して応答することがより困難になる。また、濃度勾配が大きいほど分散（拡散及び対流）による試料濃度の均一化がより顕著に表れる[31]。これらが周期 15 s 未満における振幅減衰に影響していると考えられる。一方、制御周期が短いほど、ロックインアンプが試料濃度の変化に正確に対応できると考えられ、この結果、より高頻度で次々と試料を導入することが可能になる。以上の結果より、感度と測定効率を考慮して、15 s を最適周期と決定した。

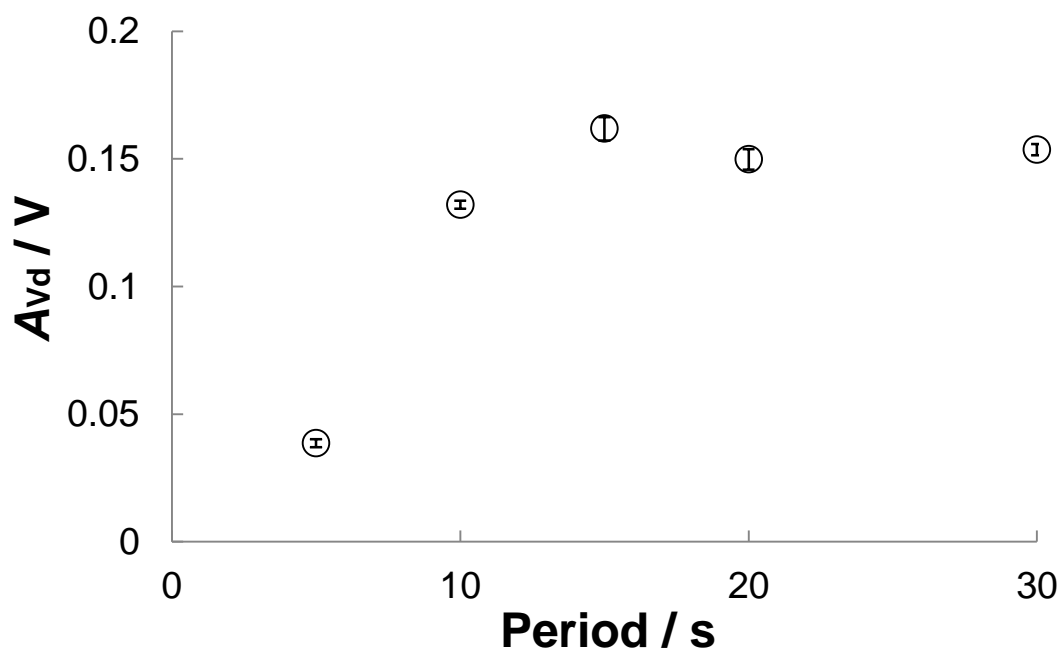


図 2.4 制御信号周期と振幅との関係

### 2.3.4 分析性能

0.0 ～ 2.9  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  のリン酸イオン溶液を試料溶液とし、検量線を作成した。リン酸イオン濃度 ( $C_{\text{Pi}}$ ) と得られた振幅 ( $A_{\text{vd}}$ ) との関係を図 2.5 に○印で示す。比較のために振幅変調を行わない連続流れ分析法 (以下、従来法) でも測定を行った。この結果を△印で示す。各々の測定法により得られた検量線 (直線回帰線) は、それぞれ  $A_{\text{vd}} = 40.41 C_{\text{Pi}} + 0.02$  ( $r^2 = 0.999$ ) ,  $V_{\text{d}} = 8.47 C_{\text{Pi}} + 0.00$  ( $r^2 = 0.967$ ) となった。前者では、 $A_{\text{vd}}$  はロックインアンプ LA によって自動的に生信号の 50 倍に増幅されて出力される。そこで、両分析法の比較のために、増幅前の振幅を□印で示す。検量線から求めた両分析法の検出限界 LOD (3.3 $\sigma$ ) は、それぞれ 0.17  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  , 1.03  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  であった。直線性 ( $r^2$ ) と検出限界 (LOD) のいずれについても、本法 (振幅変調 - ロックイン検出フロー分析法 / マラカイトグリーン法) の方が従来法に比べて優れていることが明らかである。

従来法では、検量線は下に凸の曲線となり、さらに測定値が分析履歴に依存するいわゆるヒステリシスもみられた (データは示していない)。光学セルを観察したところ、緑色の呈色物が内壁に吸着していた。各測定の直前に、2-プロパノールにより洗浄を行うことにより、 $r^2 = 0.998$  , LOD = 0.19  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  という、振幅変調フロー分析法と同レベルの分析性能が得られることがわかった。一方、本法では、呈色物の吸着によるベースラインの変動があっても、振幅  $A_{\text{vd}}$  には影響がなく、ヒステリシスも見られなかった。これらの結果から、吸光度の振幅をもとに測定を行う本法は、頻繁なシステム洗浄を行うことなく、より高感度で信頼性の高い分析が行えると言える。

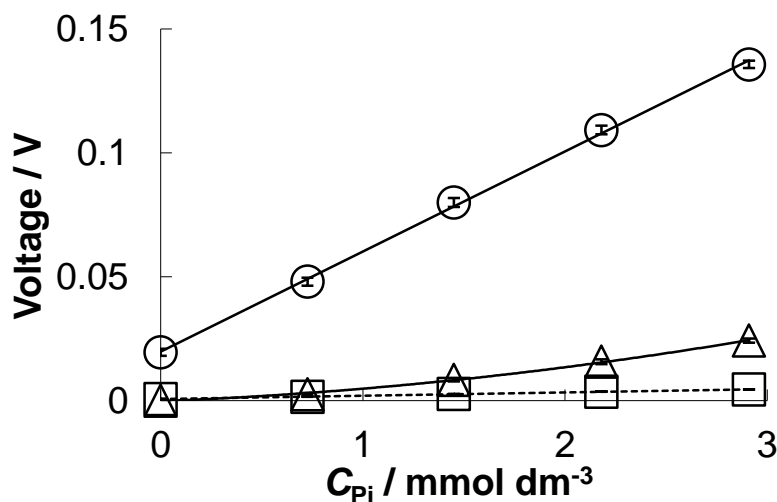


図 2.5 振幅変調フロー分析法及び連続流れ分析法によるリン酸イオンの検量線  
 ○ : 振幅変調フロー分析法により得られた検出信号の振幅  $A_{\text{vd}}$  (LA で 50 倍に増幅)  
 △ : 連続流れ分析法により得られた検出信号  $V_{\text{d}}$   
 □ : 振幅変調フロー分析法により得られた検出信号の振幅  $A_{\text{vd}}$  (増幅前の数値)



### 2.3.5 ベースライン変動の影響

前節(2.3.4 節)で述べたベースライン変動に対する本法の優位性をさらに詳しく検討するため、試薬溶液に種々濃度のファストグリーン (FG) を加え、意図的にベースラインを変動させた。この FG は食用色素の 1 つであり、マラカイトグリーン法の呈色生成物と同じ極大吸収波長 625 nm を有する。試薬溶液中の FG の濃度は 0, 1.3, 2.6, 3.8, 5.1  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  に設定した。より低濃度の FG を含むものからそれぞれ約 150 s ずつ一定流量で送液した。なお、試料溶液には 2.9  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  のリン酸イオン溶液を用いた。

検出信号  $V_d$  とその振幅  $A_{V_d}$  の経時変化を図 2.6 に示す。FG 濃度と共にベースラインが上昇するため  $V_d$  も上昇しているが、 $A_{V_d}$  については FG 濃度に関わらずほぼ一定の値 (0.23  $\pm$  0.01 V,  $n=7500$ ) が得られた。この結果から、検出信号 (吸光度) の振幅をもとに定量を行う本法は、検出信号の値そのものから定量を行う非変調の連続流れ分析法とは異なり、ベースライン変動の影響をほとんど受けないと結論した。

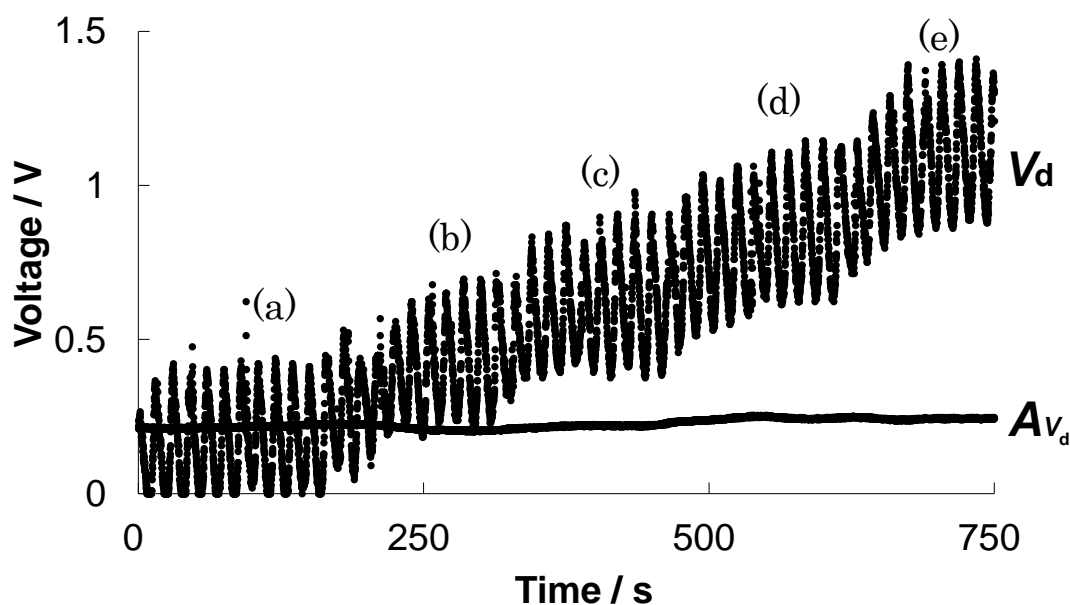


図 2.6 ベースライン変動の検出信号およびその振幅への影響

$V_d$  : 検出信号

$A_{V_d}$  : 検出信号中に含まれる制御信号と同じ周波数成分の振幅

FG 濃度( $\mu\text{mol dm}^{-3}$ ) : (a) 0 , (b) 1.3 , (c) 2.6 , (d) 3.8 , (e) 5.1

### 2.3.6 共存イオンの影響

表 2.2 に示す種々濃度の各種共存イオンを添加した  $2.9 \mu\text{mol dm}^{-3}$  リン酸溶液を試料溶液 S としてそれぞれ測定した。陽イオンは塩化物を，陰イオンはナトリウム塩を用いた。共存イオンを含まない時の分析シグナルの振幅  $A_{\text{vd}}$  を 100% とし，誤差が  $\pm 5\%$  以内に収まる最大の共存イオン濃度（共存許容濃度）を求めた。

表 2.2 共存イオンの濃度

各種共存イオン濃度 / $\text{mol dm}^{-3}$				
$\text{Na}^+$	0	0.03	0.1	0.3
$\text{K}^+$	0	0.0003	0.001	0.003
$\text{NH}_4^+$	0	0.0003	0.001	0.003
$\text{Mg}^{2+}$	0	0.003	0.01	0.03
$\text{Ca}^{2+}$	0	0.003	0.01	0.03
$\text{Fe}^{2+}$	0	0.0001	0.0003	-----
$\text{Cl}^-$	0	0.03	0.1	0.3
$\text{HCO}_3^-$	0	0.003	0.01	0.03
$\text{NO}_2^-$	0	0.003	0.01	0.03
$\text{NO}_3^-$	0	0.001	0.003	0.01
$\text{SO}_4^{2-}$	0	0.01	0.03	-----

表 2.3 に，各共存イオンの共存許容濃度を示した。これらの数値は，同様の呈色反応に対する文献値[55,56]とほぼ同じレベルであった。各共存イオンの許容濃度は，環境中の表層水中に含まれるそれぞれの濃度[57]よりも高い。したがって，本分析法を環境水中のリン酸イオンの定量に応用することは十分可能であると言える。

表 2.3 各種共存イオンの共存許容濃度

陽イオン <sup>(a)</sup>	共存許容濃度 / mol dm <sup>-3</sup>	陰イオン <sup>(b)</sup>	共存許容濃度/ mol dm <sup>-3</sup>
Na <sup>+</sup>	0.1	Cl <sup>-</sup>	0.1
K <sup>+</sup>	0.001	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0.01
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0.001	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0.01
Mg <sup>2+</sup>	0.01	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0.001
Ca <sup>2+</sup>	0.003	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0.01
Fe <sup>2+</sup>	0.0001		

(a)塩化物塩

(b)ナトリウム塩

誤差 ≤ ±5%

### 2.3.7 実試料分析への応用

本法を実試料中のリン酸イオンの定量に応用した。濃度が 0, 1.0 または 2.0 μmol dm<sup>-3</sup> になるようリン酸イオンを添加した河川水試料について測定し、リンの回収率を求めた。

表 2.4 に、実試料の分析により求められたリン酸イオン濃度、そしてリン添加回収試験におけるリン酸イオンの添加濃度と回収率を示す。リン無添加の河川水に含まれるリン酸イオンの濃度は 0.17~0.33 μmol dm<sup>-3</sup> であった。これらの数値は検出限界 LOD(3.3σ) (0.17 μmol dm<sup>-3</sup>) 以上であるが、定量限界 LOQ(10σ) (0.52 μmol dm<sup>-3</sup>) を下回った。公定法（モリブデンブルー法）でも測定を行ったが、検出不能であった（公定法の LOD(3.3σ) = 0.87 μmol dm<sup>-3</sup>）。リン添加回収試験によって得られた回収率は全て良好（100 ± 5%）であった。以上の結果から、本分析法は河川水中のリン酸イオンの定量に応用可能であると結論した。

表 2.4 各河川水の定量および添加回収試験

試料	添加濃度 / $\mu\text{mol dm}^{-3}$	検出濃度 / $\mu\text{mol dm}^{-3}$	回収率, %
吉野川	0	0.17	---
(第十堰, 板野町; 淡水	1	1.16	96.6
域)	2	2.23	101.6
吉野川	0	0.33	---
(名田橋, 板野町; 感潮	1	1.36	103.3
域)	2	2.30	98.3
鮎喰橋	0	0.30	---
(梁瀬橋; 淡水域)	1	1.30	100.0
	2	2.36	103.3

# 第3章 気節 - 非相分離／振幅変調多重化フロー分析法による高感度定量

## 3.1 緒言

第2章では呈色反応としてマラカイトグリーン法、周波数解析法としてロックイン検出法を用いた振幅変調フロー分析法 AMFA によるリン酸イオンの定量を検討した。この方法では、多重化を行っていないため多試料の同時分析には至らなかった。そこで本章では、周波数解析として高速フーリエ変換 FFT を用いることで多試料同時分析を可能にし（振幅変調多重化フロー分析法 AMMFA）、リン酸イオンの定量へと応用した。AMMFA[30, 31]の課題は、流れ系内での分散のため振幅減衰が起こり、感度が低下することである。そこで、この分散による感度の低下を防ぐため、気節分析法[1,2]、連続フロー分析法 continuous flow analysis[58-60]、モノセグメントフロー分析法 monosegmented flow analysis[61-65]などに応用されている気泡導入による液節の分節を検討した。本研究室では、戌亥らが液の流れを気泡によって分節することで、分散を気泡で隔てられた液節内に制限し、感度低下を抑える気節 - 振幅変調多重化フロー分析法を開発した[32]。しかし、気泡をそのまま検出器に導くと気泡由来の信号が液相信号の解析を困難にするため、検出器直前でテフロン (PTFE) 製の多孔質膜を用いて脱気する必要があった。このため、脱気から検出までの間の分散に基づく振幅減衰は避けられなかった。

本研究では、気泡を物理的に脱気することなく、液流とともに検出器へと導き、自作プログラムによる信号処理で気泡由来信号を除去する気節 - 非相分離振幅変調フロー分析法を開発した。気泡信号を判別するために、検出信号の傾き及び液相信号からの変位について閾値を設定し、取得信号がいずれかの閾値を超える傾きあるいは変位を与えたとき、これを気泡信号とみなして除去した。さらに、移動平均処理によって平滑化を行い、FFT の精度向上をはかった。まず、分析システムの構築とプログラムの作成を行い、メチルオレンジ水溶液を試料として、基本的分析条件を最適化した。次に、マラカイトグリーン法によるリン酸イオンの定量へと応用し、分析性能の評価や実試料への応用を行った。

## 3.2 空気分節

前節（3.1 節）で述べたように、振幅変調多重化フロー分析法 AMMFA では、分散による振幅の減衰（図 3.1 の上側の図）が見られ、試料ゾーンの分散を抑制する方法を検討する必要があることが明らかとなった。そこで、気節分析法[1,2], 連続フロー分析法 continuous flow analysis[58-60], モノセグメントフロー分析法 monosegmented flow analysis[61-65]などに応用されている気泡導入による液節の分節を AMMFA に応用した（図 3.1 の下側の図）。気節導入により分散を気泡に隔てられた液節の範囲内にとどめることができるため、気節を導入しない場合に比べて振幅の減衰を抑制し、より高感度な分析が可能になると期待される。

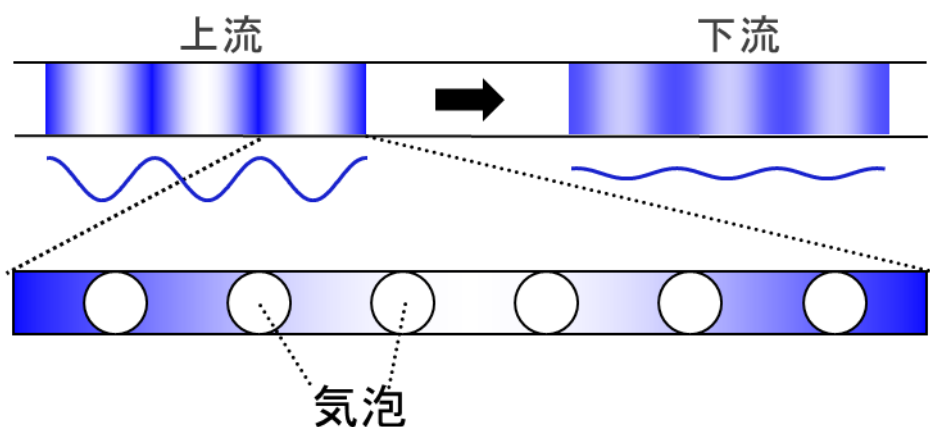


図 3.1 気泡による液流の分節

## 3.3 実験

### 3.3.1 分析システム

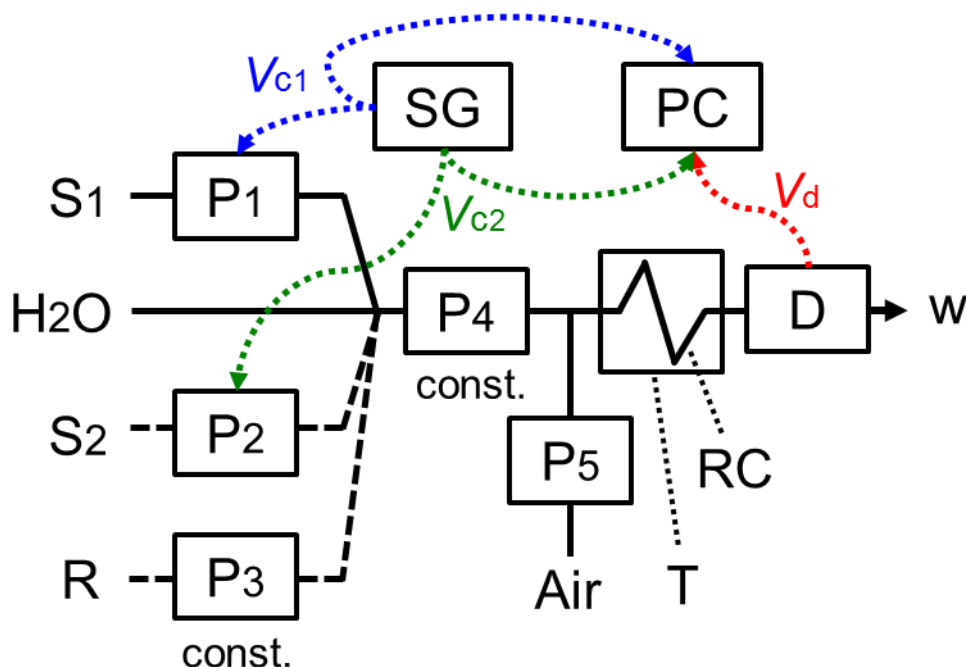


図 3.2 流路構成

基本的な流路構成を図 3.2 に示す。流路を構築するために用いた各デバイスは、特に触れない限り前章で述べたものと同じである。異なる周波数の交流波形制御信号  $V_{c1}$  および  $V_{c2}$  を用いてポンプ  $P_1$  および  $P_2$  を制御し、試料  $S_1$  および  $S_2$  の流量を変動させる。試料溶液は、受動的に吸引される水( $H_2O$ )および一定流量で  $P_3$  により送液される試薬溶液と合流する。この混合液はポンプ  $P_4$  を用いて一定流量で下流に送液される。続いてポンプ  $P_5$  により空気を一定流量で導入し、液流を気泡で分節する。相分離を行うことなく両相を紫外可視分光検出器  $D$  (島津, SPD-10AVvp 型) へと導き測定を行う。検出信号  $V_d$  は、AD/DA コンバータを介してデジタル化され、ラップトップ型コンピュータ  $PC$  に取得され、Excel 形式で  $V_{c1}$  および  $V_{c2}$  とともに保存される。気泡由来信号の除去と平滑化のためのアルゴリズムを導入した AMMFA プログラムを新たに作成した。 $V_d$  を高速フーリエ変換により周波数解析することで、それぞれの試料濃度に対応する周波数成分の振幅  $A$  を得る。

### 3.3.2 試薬および試料

実験に使用した試薬は関東化学, ナカライテスク, 和光純薬工業より購入した特級試薬で, さらなる精製を行わずに用いた。調製に使用した水 (溶媒) は, 逆浸透水をザルトリウス社製アリウム 611DI 型超純水製造装置により精製したものである。

呈色反応試薬は,  $1.6 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$  モリブデン酸アンモニウム,  $4.0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  マラカイトグリーン,  $1.3 \text{ mol dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4$ , および安定剤として 0.5% ポリビニルアルコール (重合度: 2000) を含む水溶液である。試料であるリン酸イオン溶液は, リン酸二水素カリウムを水に溶かして調製した。

実試料として, 徳島県の吉野川, 人工池 (徳島大学新蔵キャンパス), 鮎喰川, 袋井用水, 勝瑞城堀, 飯尾川, 中池で水試料を採取した。これら試料を平均孔径  $0.45 \mu\text{m}$  の使い捨てディスクフィルター (関東化学) によりそれぞれろ過し, ろ液をポリプロピレン容器中で冷蔵保存 ( $4^\circ\text{C}$ ) した。

### 3.3.3 AMMFA プログラムの基本原則

開発した AMMFA プログラムの主要なソフトウェアパラメータとその設定値の一例を表 3.1 に示す。この場合,  $S_1$  流量を制御する信号  $V_{c1}$  は, 周期が 30 s, 振幅 (ピーク間電圧) が 1.4 V の交流波形信号である。また,  $S_2$  流量を制御する信号  $V_{c2}$  は, 周期が 20 s, 振幅 (ピーク間電圧) が 1.4 V の交流波形信号である。検出器からの出力信号  $V_d$  は, 振幅変調された 2 試料の情報が多重化された波形を示し, 周期 60 s ( $= V_{c1}$  および  $V_{c2}$  周期の最小公倍数) の周期信号となる。この周期が FFT 解析窓の長さとして自動的に設定される。サンプリング頻度 (Sampling frequency) は, FFT 解析窓内に  $2^n$  個のデータを取得する必要があるために, 入力値 5 Hz が自動的に 8.53333 Hz に変換される。この理由は, FFT アルゴリズム中のバタフライ演算を行う際に, 解析に用いるデータ数を  $2^R$  (ただし,  $R$  は整数で  $R \leq n$ ) にしなければならないからである。すなわち, 解析窓中で  $2^n / 2^R$  個毎のデータがピックアップされ, こうして得られた  $2^R$  個のデータを用いて FFT 処理が行われる。表 3.1 に示した条件においては, 周期 60 s あたり 512 ( $= 60 \times 8.53333 = 2^9$ ) 個のデータが取得され, 8 個毎のデータ, 計 8 個 (Number of data for FFT analysis) が後述の FFT 計算に使用される。FFT が実行される時間間隔 (Interval of FFT analysis) の入力値が 2 s から 1.875 s に変換される理由も, サンプリング頻度と同様に, FFT アルゴリズムに対応させるためである。



表 3.1 主要なソフトウェアパラメータ

Collect time / min (測定時間)	3
Sampling frequency / Hz (サンプリング頻度)	8.53333 (5)
$V_{c1}$ Period / s (制御信号 $V_{c1}$ の周期)	30
Peak voltage, high / V (制御信号 $V_{c1}$ の上限, 極大値)	1.4
Peak voltage, low / V (制御信号 $V_{c1}$ の下限, 極小値)	0
$V_{c2}$ Period / s (制御信号 $V_{c2}$ の周期)	20
Peak voltage, high / V (制御信号 $V_{c2}$ の上限, 極大値)	1.4
Peak voltage, low / V (制御信号 $V_{c2}$ の下限, 極小値)	0
Number of data for FFT analysis (FFT に用いるデータ数)	8
Interval of FFT analysis / s (FFT 分析を行う間隔)	1.875 (2)

2 列目の括弧内の値は測定者が入力した値である。FFT のアルゴリズムに適するように値が自動的に変換される。

15 mg dm<sup>-3</sup> メチルオレンジ水溶液を試料溶液  $S_1$  および  $S_2$  として用いた場合の測定結果をもとに、本プログラムの FFT アルゴリズムについて説明する。同アルゴリズムの導入にあたっては中村の成書[66]を参考にした。図 3.3 に、制御信号  $V_{c1}$ ,  $V_{c2}$  と検出信号  $V_d$  (測定波長 470 nm) の経時変化を示す。 $V_d$  は周期 30 s の  $V_{c1}$  および周期 20 s の  $V_{c2}$  に基づく試料流量の周期的変動を反映していることがわかる。この  $V_d$  は、高速フーリエ変換 FFT によって、試料に基づく周波数成分とノイズ等に基づく他の周波数成分に分けることができる。以下に FFT の計算式を示す。

$$X_k = \frac{1}{N} \sum_{n=0}^{N-1} x_n \exp\left(-j \frac{2\pi nk}{N}\right) \quad (1)$$

式 (1) で、 $N$  は FFT 分析に用いるデータ数 (ここでは 8) を、 $j$  は虚数単位を表す。FFT に用いるデータ数が  $2^R$  個 ( $R$  は整数) のとき、サンプリング定理により第  $2^{R-1}$  高調波の成分までを意味のあるデータとして求めることができる。この定理により、8 個のデータを FFT 解析に用いる本測定では、直流成分 ( $DC$ ) の値と基本波成分の振幅 ( $A_{1st}$ ) および第 2 から第 4 高調波成分の振幅 ( $A_{2nd}$ ,  $A_{3rd}$ ,  $A_{4th}$ ) を、以下の式(2) ~ (6)により得ることができる。

$$DC = |X_0| \quad (2)$$

$$A_{1st} = 2 |X_1| \quad (3)$$

$$A_{2nd} = 2 |X_2| \quad (4)$$

$$A_{3rd} = 2 |X_3| \quad (5)$$

$$A_{4th} = |X_4| \quad (6)$$

$S_1$  および  $S_2$  の制御周期の最小公倍数 (60 s) を FFT 解析窓の長さとしているため、第 2 高調波成分の振幅  $A_{2nd}$  および第 3 高調波成分の振幅  $A_{3rd}$  がそれぞれ  $S_1$  および  $S_2$  試料溶液中のメチルオレンジ濃度に対応する。

図 3.3 に示す  $V_d$  を FFT 解析した結果を図 3.4 に示す。時間経過と共に FFT 解析窓を動かすことにより、振幅の経時変化をリアルタイムで測定することが可能である（本測定では前述のように 1.875 s ごと）。第 2 高調波成分( $A_{2nd}$ )および第 3 高調波成分( $A_{3rd}$ )だけでなく、基本波成分の振幅 ( $A_{1st}$ ) および第 4 高調波成分の振幅 ( $A_{4th}$ ) もわずかに得られている。本実験では、 $A_{1st}$  および  $A_{4th}$  に対応する制御信号（それぞれ周期 60 s および 15 s）は用いていないので、理論上これらの振幅は 0 を示さなければならない。したがって、わずかに得られた  $A_{1st}$  および  $A_{4th}$  は、試料の分散にともなう検出信号の波形の変化やノイズに基づく誤差によるものと考えられる。なお、直流成分  $DC$  は解析窓内の検出信号  $V_d$  の平均値に相当する。

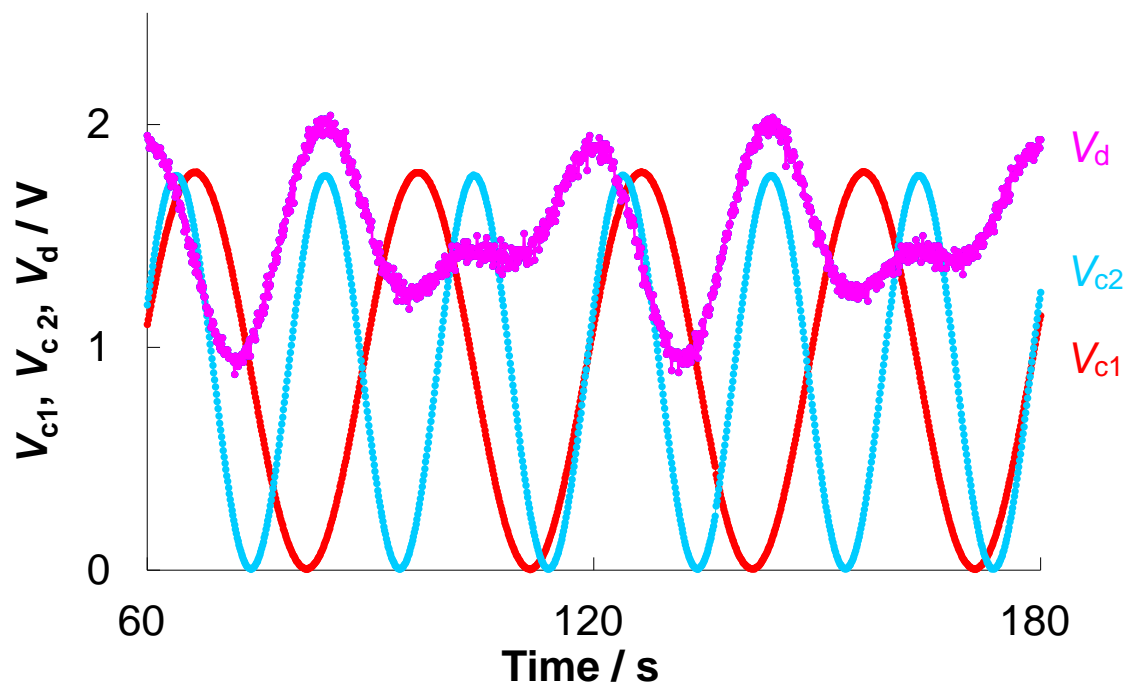


図 3.3 制御信号および検出信号

$V_{c1}$  および  $V_{c2}$  : 周期 30 および 20 s の制御信号       $V_d$  : 検出信号

$S_1$  および  $S_2$  の試料溶液は、ともにメチルオレンジ水溶液  $15 \text{ mg dm}^{-3}$

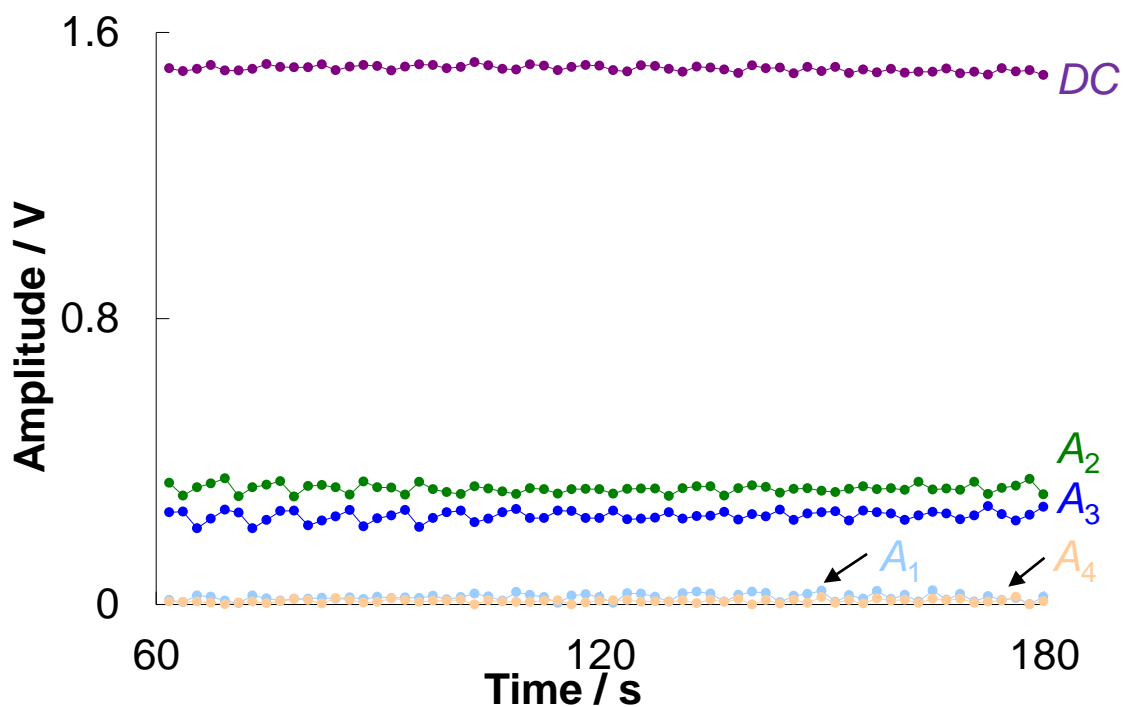


図 3.4 高速フーリエ変換によって求めた検出信号の各周波数成分の振幅の経時変化

DC : 直流成分       $A_1 - A_4$  : 基本波成分および第 2 から第 4 高調波成分の振幅

### 3.3.4 信号処理による気泡シグナルの除去と平滑化

テクニコン社によって開発された「オートアナライザー」は、最新機種において信号処理による空気認識法が採用されている。これとは別に、Habig ら[67]は、コンダクタンスの変化に基づいた信号処理の空気認識法である「バブルゲーティング」を報告した。さらに電子バブルゲート[68,69]、屈折率に基づいたバブルゲート[70]やデジタルバブルゲート[71]なども報告されている。Liu と Dasgupta はフローインジェクション抽出システムにおける水相/有機相認識のための二波長分光測定法[72]と導電率測定法[73]を報告した。

本研究の気節 - 非相分離振幅変調多重化フロー分析法では、多孔質膜などを利用した物理的脱気は行わず、気泡を液流とともに検出器へと導き、信号処理で気泡由来信号の除去を行っている。図 3.5 に示すように、気泡由来信号は信号の形状に基づいて認識される。気泡は液節信号よりはるかに大きい検出信号を与える。そこで、検出信号  $V_d$  の傾き ( $dV_d/dt$ ) および液節信号からの変位 ( $\Delta V_d$ ) についてそれぞれ閾値(Threshold1, Threshold2)を設定し、取得した  $V_d$  について  $dV_d/dt$  あるいは  $\Delta V_d$  のいずれかあるいは両方がそれぞれの閾値を超えたとき、この  $V_d$  を気泡ノイズとみなして排除した。この場合、直近の液節  $V_d$  の値をその時刻における  $V_d$  とした。信号処理による気泡由来信号の除去と直近の液節信号の維持の結果、得られる検出信号は階段状になる。そこで、FFT の精度の向上のため、移動平均処理による信号平滑化を行った。

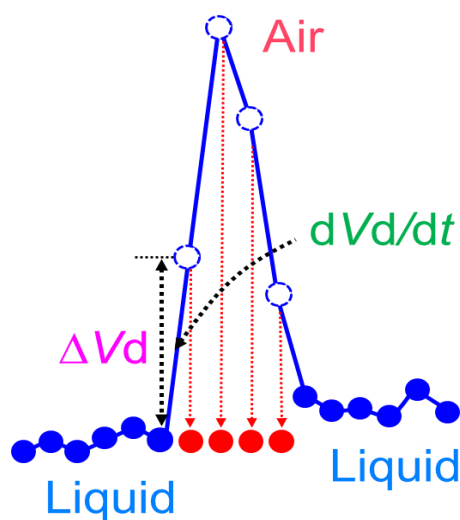


図 3.5 プログラム処理による気節の除去

## 3.4 結果と考察

### 3.4.1 信号処理による相認識の最適化

信号処理によって相認識を行うために、試料溶液として  $15.0 \text{ mg dm}^{-3}$  ( $45.8 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ ) メチルオレンジを用いて 2 種の閾値の最適化を行った。この検討では、図 3.2 において破線で示した  $P_2$  チャンネルおよび  $P_3$  チャンネルは閉鎖した。試料溶液は  $P_1$  チャンネルのみから送液した。 $P_1$  ポンプを交流波形制御信号  $V_c$  によって制御し、最大流量が  $0.9 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ 、最小流量が  $0 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$  となるようにした。また、 $P_4$  ポンプおよび  $P_5$  ポンプの流量はそれぞれ  $1.0 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ 、 $0.18 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$  とした。分析波長は  $470 \text{ nm}$  である。図 3.6A は、制御周期  $30 \text{ s}$  におけるメチルオレンジの典型的な生シグナルである。上向きの鋭いピークは気泡に由来する信号である。信号処理による気泡信号除去を行うために、データを詳細に検討しながら試行錯誤を繰り返し、気泡由来信号を完全に除去することが可能な 2 種の閾値を決定した。図 3.6 に示した例では、検出信号  $V_d$  の傾きの絶対値として  $1.0 \text{ V s}^{-1}$  を、そして液節信号からの変位として  $0.7 \text{ V}$  をそれぞれ閾値として採用した。図 3.6B は、これら閾値を用いて気相認識を行った後の検出信号を示しており、気泡由来の信号を完全に除去できていることがわかる。しかし、気相が認識された時刻では直近の液相信号の値を維持したため、得られたデータは階段状のプロファイルを示した。

そこで、FFT の精度向上のために、階段状の脱気検出信号を移動平均処理によって平滑化した。まず、移動平均に用いるデータの数について検討した。データとして 11, 21, 31, 41, 51, 71, 101 を検討し、それぞれの結果を移動平均処理前の結果と比較した。図 3.7 に、移動平均に用いるデータ数と振幅との関係を示す。基本波成分（周期:  $30 \text{ s}$ ）の振幅  $A_{1st}$  の相対標準偏差 RSD は、移動平均処理を行うことにより改善され、データ数が 31 点以上ではほぼ一定の値を示した。移動平均に用いるデータ数 1(移動平均処理を行わない), 11, 21, 31, 41, 51, 71, 101 に対して得られた相対標準偏差 RSD は、それぞれ 3.1%, 1.9%, 1.1%, 0.9%, 1.3%, 1.2%, 0.6%, 0.9% であった。しかし、31 点より大きな値では過度な平滑化により、振幅  $A_{1st}$  は減少してしまった。移動平均に用いるデータ数 1(移動平均処理を行わない), 11, 21, 31, 41, 51, 71, 101 に対して得られた振幅  $A_{1st}$  の値は、それぞれ 0.774, 0.808, 0.807, 0.808, 0.782, 0.752, 0.710, 0.638 V であった。以上の結果より、高い振幅が得られ、かつ RSD も小さい 31 点を最適な移動平均処理データ数と決定した。図 3.6C は、平滑化処理後の検出信号を示している。信号処理による気泡信号除去と移動平均処理を併用することにより、高い振幅を維持したまま滑らかな検出信号が得ることができた。

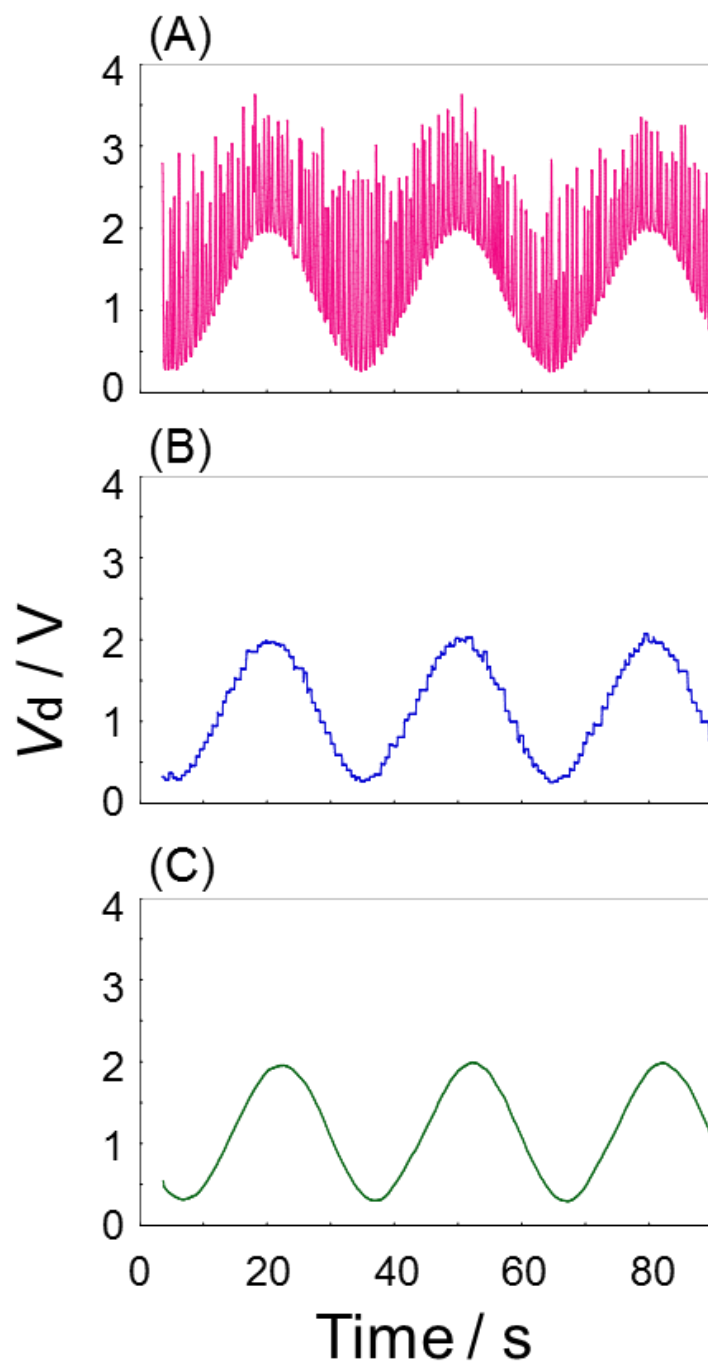


図 3.6 気節 - 非相分離法における気節信号の除去

(A) 生シグナル

(B) 信号処理による気節信号除去後のシグナル

(C) 信号処理による気節信号除去および移動平均処理後のシグナル

サンプル: メチルオレンジ溶液 ( $15 \text{ mg dm}^{-3}$ ),  $V_c$  周期: 30 s

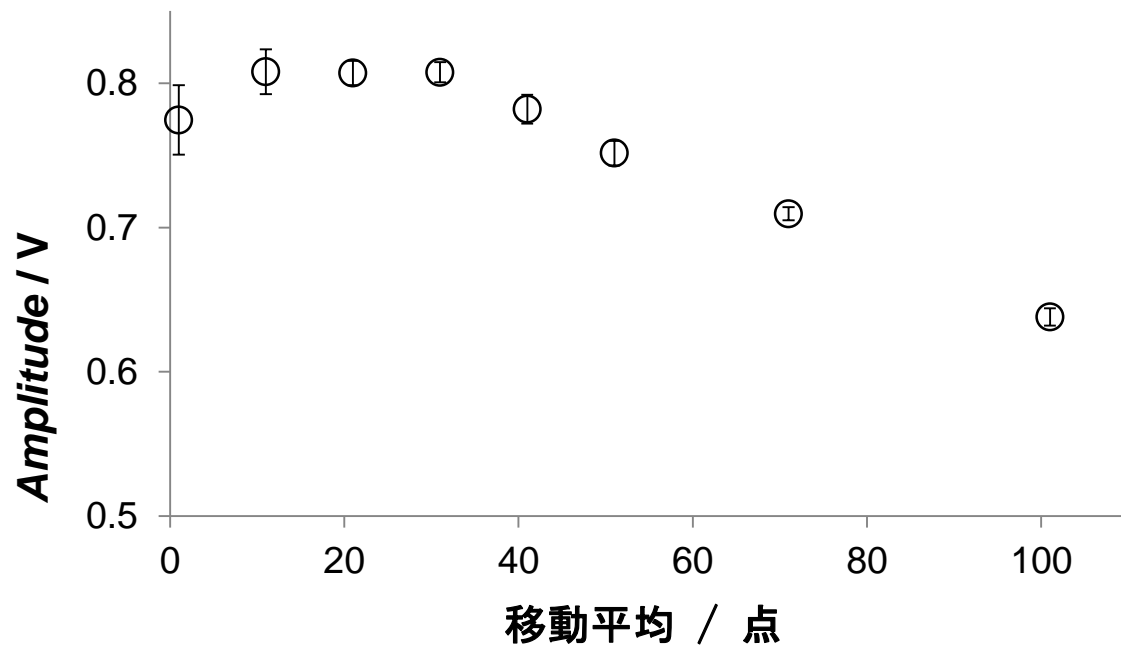


図 3.7 各移動平均に用いるデータ数に対応する分析シグナル

### 3.4.2 気節 - 非相分離振幅変調フロー分析法（単一試料の分析）

前節（3.4.1 節）で述べた研究において、気節 - 非相分離法が確立できたので、最終目標である多重化（多試料同時分析）を行う前に、単一試料（図 3.1 の  $S_2$  の流路を閉鎖する）による振幅変調フロー分析法 AMFA により分析性能を評価した。5 種のメチルオレンジ標準溶液（ $0\text{--}15\text{ mg dm}^{-3}$ ）を用いて検量線を作成し、気節 - 非相分離 AMFA（本法）、多孔質膜による物理的脱気を伴う気節 - 相分離 AMFA[32]および気節を導入しない AMFA[30]で比較検討を行った。 $P_1$ 、 $P_4$ および  $P_5$  ポンプの流量は、それぞれ  $0\text{--}0.9$ （周期  $30\text{ s}$ ）、 $1.0$ （一定）、 $0.18\text{ cm}^3\text{ min}^{-1}$  とした。 $P_5$  チャンネルは、気節を導入しない AMFA では閉鎖した。気節 - 非相分離 AMFA、気節 - 相分離 AMFA、AMFA の検量線および直線性は、それぞれ  $A_{1st} = 0.058 C_{MO} + 0.001$  ( $r^2 = 0.9999$ )、 $A_{1st} = 0.039 C_{MO} + 0.002$  ( $r^2 = 0.9998$ )、 $A_{1st} = 0.033 C_{MO} + 0.005$  ( $r^2 = 0.9990$ ) と求められた。ここで  $C_{MO}$  はメチルオレンジ濃度 [ $\text{mg dm}^{-3}$ ] を示す。また、検出限界 LOD ( $3.3\sigma$ ) は、それぞれ  $0.348$ 、 $0.406$ 、 $0.885\text{ mg dm}^{-3}$  と求められた。

さらに、リン酸イオン標準溶液（ $0.0\text{--}15.5\text{ }\mu\text{mol dm}^{-3}$ ）を用いて検量線を作成し、気節 - 非相分離 AMFA（本法）および AMFA で比較検討を行った。 $P_1$ 、 $P_3$ 、 $P_4$ および  $P_5$  ポンプの流量は、それぞれ  $0\text{--}0.5$ （周期  $30\text{ s}$ ）、 $0.45$ 、 $1.0$ 、 $0.18\text{ cm}^3\text{ min}^{-1}$  とした。本法と AMFA の検量線および直線性は、それぞれ  $A_{1st} = 0.020 C_{Pi} + 0.011$  ( $r^2 = 0.9990$ )、 $A_{1st} = 0.012 C_{Pi} + 0.002$  ( $r^2 = 0.9980$ ) と求められた。ここで  $C_{Pi}$  はリン酸イオン濃度 [ $\mu\text{mol dm}^{-3}$ ] を示す。LOD ( $3.3\sigma$ ) は、それぞれ  $0.85$ 、 $1.31\text{ }\mu\text{mol dm}^{-3}$  と求められた。

これらの結果から、気節法と信号処理による相認識法を導入することにより、AMMFA の感度と検出限界の改善が可能であることが示された。

気節-非相分離 AMFA を実試料中のリン酸イオンの定量に応用した。吉野川、人工池（徳島大学新蔵キャンパス）、鮎喰川の 3 箇所の実試料を用いた。検量線は、リン酸イオン標準溶液（ $0\text{--}15.5\text{ }\mu\text{mol dm}^{-3}$ ）を用い同様の方法で作成した。それぞれの実試料に対して既知の濃度のリン酸イオン（最終濃度として  $0$ 、 $5$ 、 $10\text{ }\mu\text{mol dm}^{-3}$ ）を添加することにより添加回収試験を行い、回収率を求めた。その結果、実試料のリン酸イオン濃度は全て検出限界以下であった。また、添加回収試験によって得られた回収率は全て良好（ $100 \pm 5\%$ ）であった。



### 3.4.3 気節 - 非相分離振幅変調多重化フロー分析法 (2 試料同時分析)

気節 - 非相分離法を振幅変調多重化フロー分析法 AMMFA に応用し, 2 試料同時分析を行った。5 種のリン酸イオン標準溶液を用いて検量線を作成した。試料溶液  $S_1$  として 0, 7.75, 15.50, 23.25, 31.00  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  のリン酸イオン溶液を,  $S_2$  として 31.00, 23.25, 15.50, 7.75, 0  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  のリン酸イオン溶液をそれぞれポンプ  $P_1$  および  $P_2$  (図 3.1 参照) で送液した。これら  $P_1$  および  $P_2$  ポンプをそれぞれ交流波形制御信号  $V_{e1}$  および  $V_{e2}$  によって制御し, とともに最大流量が 0.25  $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$ , 最小流量が 0  $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$  となるように設定した。 $P_3$ ,  $P_4$  および  $P_5$  ポンプの流量は, それぞれ 0.6, 1.2 および 0.13  $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$  とした。 $S_1$  および  $S_2$  の流量は, それぞれ 30 s および 20 s 周期で制御した。この場合, FFT 解析窓の長さは 60 s である。検出信号  $V_d$  の第 2, 第 3 高調波成分の振幅は, それぞれ  $S_1$  および  $S_2$  のリン酸イオンの濃度に対応する。検出信号  $V_d$  の傾きおよび液節信号からの変位の閾値は, それぞれ 0.45  $\text{V s}^{-1}$ , 0.35 V とした。気節 - 非相分離 AMMFA (本法) と AMMFA の検量線の結果を図 3.8 に示す。気節・非相分離 AMMFA における  $S_1$  および  $S_2$  の回帰直線は, リン酸イオン濃度を  $C_{\text{Pi}}$  とすると,  $A_{2\text{nd}} = 0.0041 C_{\text{Pi}} + 0.0061$ ,  $A_{3\text{rd}} = 0.0033 C_{\text{Pi}} + 0.0040$  となり, 直線性はそれぞれ  $r^2 = 0.9999$ , 0.9998 と良好であった。検出限界は, それぞれ 0.52, 0.75  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  (16.1, 23.2  $\mu\text{g dm}^{-3}$  as P) と求められた。一方, AMMFA における  $S_1$  および  $S_2$  の回帰直線は, それぞれ  $A_{2\text{nd}} = 0.0028 C_{\text{Pi}} + 0.0042$ ,  $A_{3\text{rd}} = 0.0020 C_{\text{Pi}} + 0.0040$  となり, 直線性はそれぞれ  $r^2 = 0.9984$ , 0.9930 であった。また, LOD ( $3.3\sigma$ ) は, それぞれ 2.35 および 4.97  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  であった。これらのことから, 気節・非相分離 AMMFA では AMMFA に比べ,  $S_1$  および  $S_2$  における感度がそれぞれ 1.46 および 1.66 倍に上昇していることがわかる。 $S_1$  と  $S_2$  の傾きは制御周期に依存した値を示す。これは, 制御周期が短いほど試料の細管内での濃度勾配が急であり, 分散による濃度の均一化により振幅が減衰するためである[31,32]。結果として,  $S_1$  (制御周期: 30 s) に比べ  $S_2$  (制御周期: 20 s) の傾きは小さな値となる。また, 気節導入の効果は, より短い周期において効果的である[32]。31.0  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  リン酸イオンの定量における 60 点連続した測定値の精度 (RSD) は,  $S_1$  および  $S_2$  それぞれ 2.35% および 4.59% であった。図 3.9 に検出信号のシグナル例を示す。赤は生の検出信号, 紫は信号処理による脱気後の信号, 緑はさらに平滑化を行って得られた信号である。

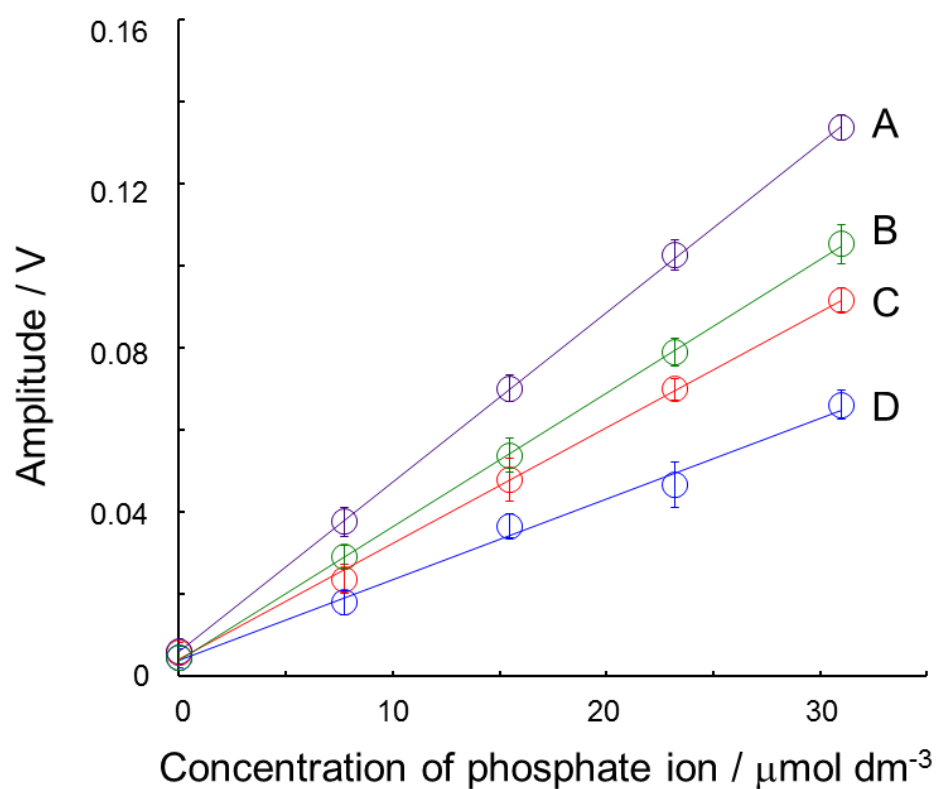


図 3.8 気節 - 非相分離振幅変調多重化フロー分析法および振幅変調多重化フロー分析法によるリン酸イオンの検量線

A : 気節 - 非相分離 AMMFA により得られた  $S_1$  の検出信号の振幅

B : 気節 - 非相分離 AMMFA により得られた  $S_2$  の検出信号の振幅

B : AMMFA により得られた  $S_1$  の検出信号の振幅

B : AMMFA により得られた  $S_2$  の検出信号の振幅

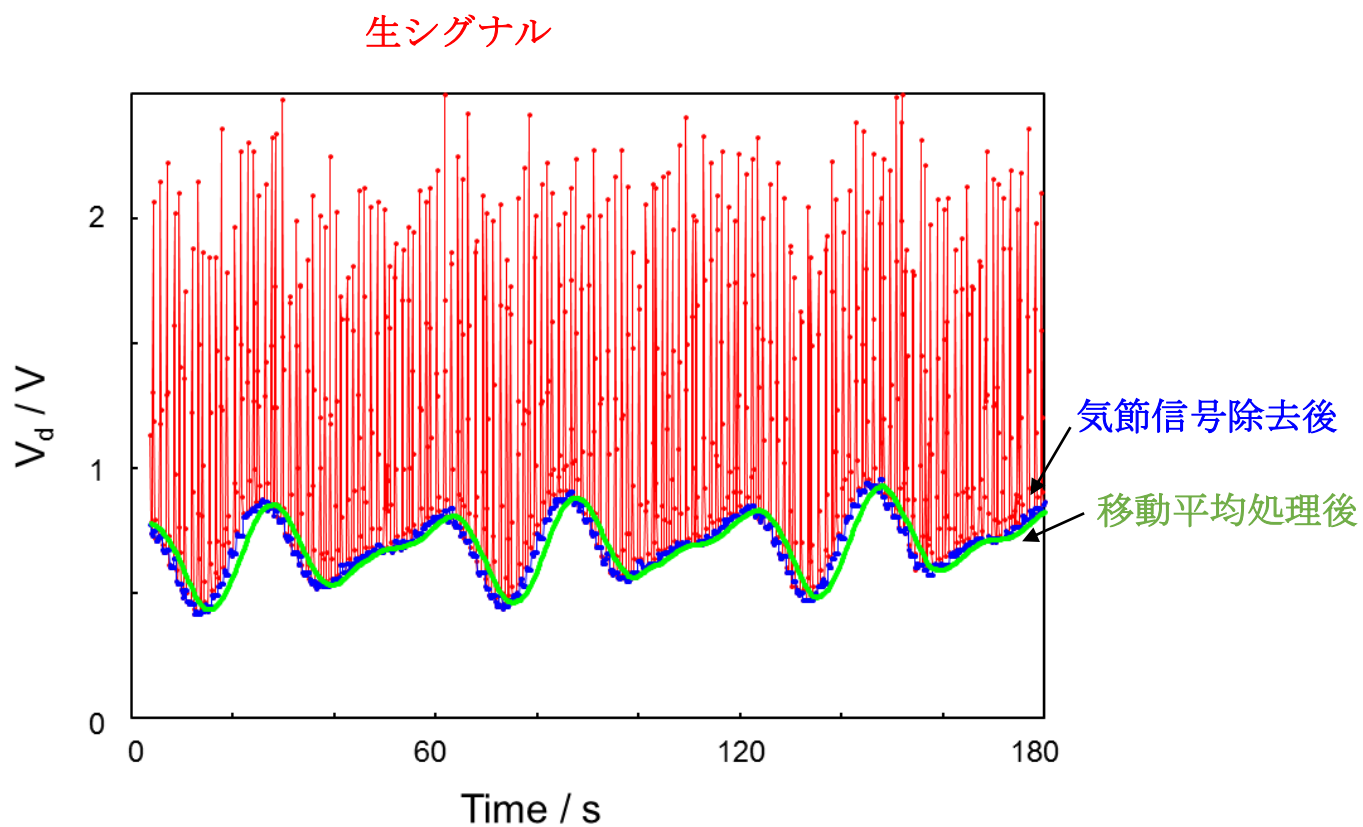


図 3.9 気節 - 非相分離 AMMFA における検出信号  
サンプル: リン酸イオン溶液 ( $11.62 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ),  
 $V_{c1}$  周期: 30 s,  $V_{c2}$  周期: 20 s

### 3.4.4 実試料分析への応用

気節-非相分離 AMMFA を実試料中のリン酸イオンの定量に応用した。袋井用水、勝瑞城堀、飯尾川、そして中池の4箇所の実試料を用いた。本システムにおける連続的な測定の妥当性を評価するために、 $S_1$  チャンネルから袋井用水、勝瑞城堀、飯尾川、中池、そして袋井用水の順に連続的に送液した。また、各サンプルの送液時間は5分、サンプル交換は手動で行った。一方、 $S_2$  チャンネルからは、袋井用水を送液し続けた。 $V_{e1}$  および  $V_{e2}$  の周期は、それぞれ30 s および 20 s とした。図 3.10 および図 3.11 は、それぞれ検出信号  $V_d$  および  $V_a$  の各周波数成分の振幅を示している。図 3.11 における第2高調波  $A_{2nd}$  および第3高調波  $A_{3rd}$  成分は、それぞれ  $S_1$  および  $S_2$  中のリン酸イオン濃度に対応している。また、本実験では、基本波  $A_{1st}$  および第4高調波  $A_{4th}$  に対応する制御信号は用いていないので、理論上これらの振幅は0となるはずであるが、分散による波形の変化やノイズによりわずかながら振幅として求められる。試料が入れ替わった時には、一定の周期信号が無限に続くというデジタルフーリエ変換の前提が崩れるので、いずれの周波数成分の振幅にも乱れが生じる。なお、直流成分(DC)はFFT解析窓内の検出信号  $V_d$  の平均値に対応しており、2試料中のリン酸イオンの濃度に依存して変化する。図 3.10 および図 3.11 において、 $V_d$  と DC は測定過程で上向きにドリフトしていることがわかる。このドリフトは、光学セルへのマラカイトグリーンとモリブドリン酸の緑色イオン対の吸着に起因する[56]。それにもかかわらず、図 3.11 に示されるように第3高調波( $A_{3rd}$ )は、ほぼ一定の値となった。これらの結果は、AMMFA では吸光度そのものの値ではなく吸光度の振幅に基づいて定量しているため、ロックイン検出を用いた研究(第2章参照)と同様に、ベースライン変動の影響を受けにくいことを示している。

リン酸イオン標準溶液 ( $0 - 15.5 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ) を用い同様の方法で検量線を作成し、実試料中のリン酸イオンの濃度を求めた。結果を表 3.2 に示す。図 3.12 の第2高調波 ( $A_{2nd}$ ) から得られた袋井用水、勝瑞城堀、飯尾川のリン酸イオン濃度は、それぞれ  $8.26 \pm 0.33$  ( $n = 128$ ; time = 80.51 - 318.63 s),  $4.25 \pm 0.33$  ( $n = 128$ ; time = 448.01 - 686.03 s),  $3.58 \pm 0.40$  ( $n = 128$ ; time = 748.01 - 986.13 s)  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  であった。同様の測定を再度行い、再現性を検証した。得られた実試料濃度は、それぞれ  $8.46 \pm 0.42$ ,  $4.35 \pm 0.23$ ,  $3.32 \pm 0.37 \mu\text{mol dm}^{-3}$  であった。また、中池のリン酸イオン濃度は検出限界以下であった。公定法(アスコルビン酸還元を用いたモリブデンブルー法(バッチ法); 測定波長 880 nm [52])によりリン酸イオン濃度を測定し比較検討を行った。公定法により得られた濃度は、それぞれ  $8.273 \pm 0.056$  ( $n = 3$ ),  $4.633 \pm 0.028$  ( $n = 3$ ),  $3.484 \pm 0.028$  ( $n = 3$ )  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  および N.D. であった。

それぞれの試料に対して既知の濃度のリン酸イオン(最終濃度として0あるいは  $10 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ) を添加することにより添加回収試験をおこなった。参考として、各実試料の pH とアルカリ性過マンガン酸カリウム法によって COD[74] を測定した。添加回収試験の結果を表 3.2 に示す。袋井用水、勝瑞城堀、飯尾川、中池の pH は、それぞれ 7.0, 6.9, 7.0, 6.7 であった。COD はそれぞれ 8.6, 10.0, 9.4, 10.1  $\text{mg dm}^{-3}$  と求められた。添加回収試験によって得られた回収率は全て良好 (97.5 - 104.5%) であった。

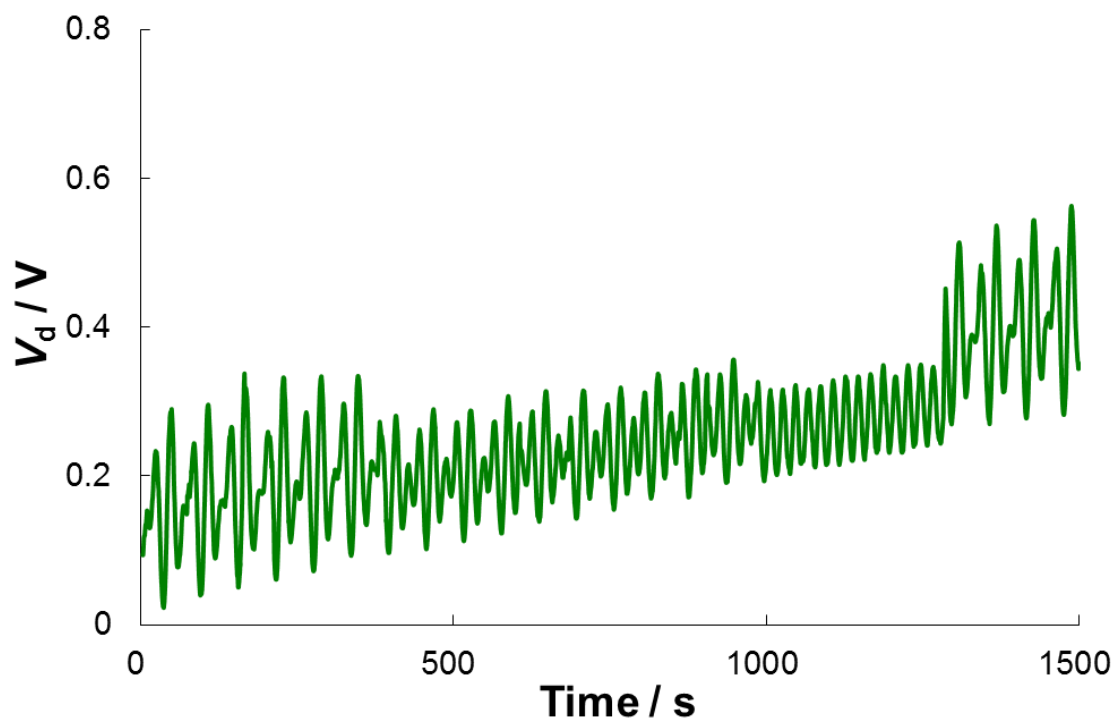


図 3.10 2 試料中のリン酸イオンの連続測定における検出信号  $V_d$

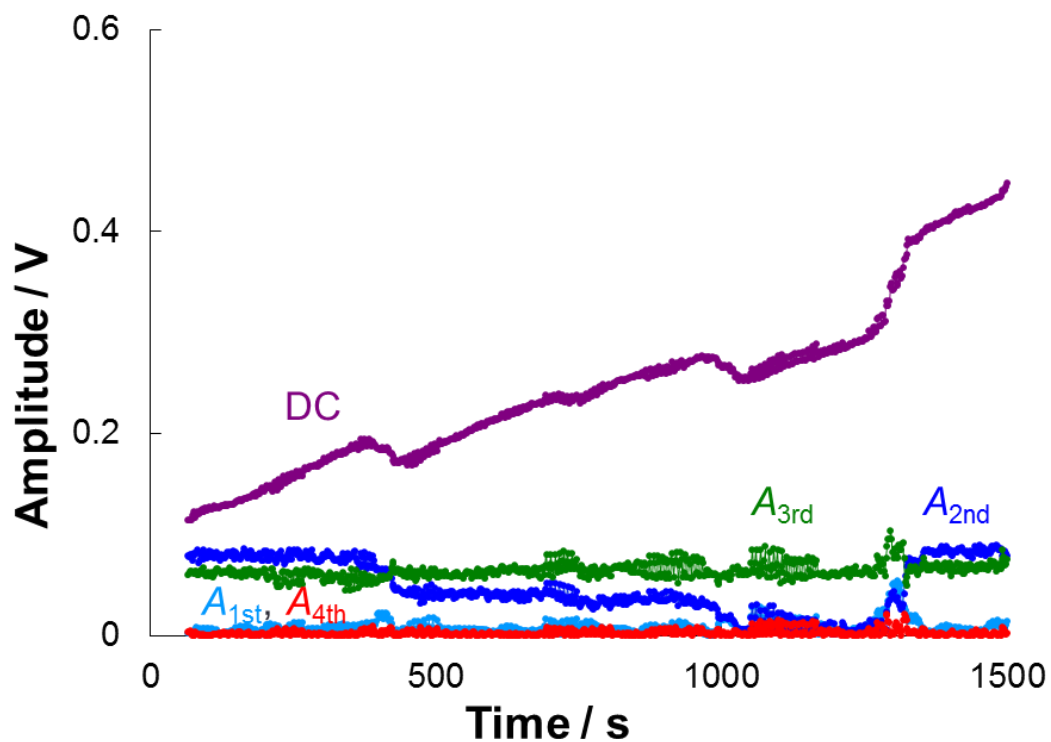


図 3.11 高速フーリエ変換 FFT により求めた検出信号  $V_d$  の各周波数成分の振幅

DC : 直流成分      $A_1 - A_4$  : 基本波成分および第 2 から第 4 高調波成分の振幅  
 第 2 および第 3 高調波成分の振幅は、それぞれ  $S_1$  および  $S_2$  のリン酸イオン濃度に対応している

表 3.2 実試料中のリン酸イオンの定量

Sample		$C_{\text{Pi,Add.}}/\mu\text{mol dm}^{-3}$		$C_{\text{Pi,Fnd.}}/\mu\text{mol dm}^{-3}$		Recovery, %	
S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>
A	B	0	0	8.68±0.27	4.22±0.34	—	—
				8.43±0.25	4.37±0.40	—	—
		10	0	18.81±0.35	4.38±0.52	101.3	—
				18.41±0.68	4.13±0.85	99.9	—
		0	10	8.38±0.62	14.57±0.49	—	103.5
				8.91±0.49	14.47±0.74	—	101.0
		10	10	18.42±0.86	14.67±0.82	97.5	104.5
				18.70±0.56	14.55±0.73	102.7	101.7
C	D	0	0	3.53±0.36	n.d.	—	—
				3.49±0.29	n.d.	—	—
		10	0	13.74±0.52	n.d.	102.1	—
				13.84±0.49	n.d.	103.5	—
		0	10	3.68±0.34	10.46±0.35	—	101.3
				3.59±0.37	10.53±0.39	—	101.9
		10	10	13.87±0.75	10.49±1.04	103.4	101.7
				13.73±0.33	10.53±0.43	101.4	101.8

サンプリング場所 (A) 袋井用水, (B) 勝瑞城堀, (C) 飯尾川, (D) 中池

## 第4章 内標準 - 振幅変調フロー分析法

### 4.1 緒言

前章までの研究において明らかになったように、検出信号の値そのものからではなく、検出信号の振幅をもとに定量を行う振幅変調多重化フロー分析法 (AMMFA) は、周波数解析により複数の試料を同時に分析できるだけでなく、沈殿や呈色物質の光学セル窓への吸着などによるベースライン変動の影響を受けにくいという長所を有する。しかし、一般的なフロー分析法と同様に、分析の信頼性はポンプの性能に依存する。すなわち、ポンプやポンプチューブに起因した流量のゆらぎが生じた場合には、周波数解析によって得られた振幅もゆらぐことになる。このような流量の不安定性による誤差を防ぐためには、定期的に測定を中断し、流量校正を行ったり、標準液を用いて検量線を新たに作成したりする必要がある。そこで、本章の研究では AMMFA の信頼性 (流量のゆらぎに対する頑健性 **robustness**) の向上と校正頻度の低減をめざして、内標準法の導入を検討した。内標準法は、一般的にガスクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィーあるいはキャピラリー電気泳動のような分離分析法や原子スペクトル分析法 (たとえば[75,76]) などにおいて用いられる。近年では、Gimenes らによってアンペロメトリーへの応用が報告されている[77]。本研究では、単試料を対象として内標準 - 振幅変調フロー分析法を検討する。原理的には、この内標準法は複数試料を対象とする振幅変調多重化フロー分析法にも応用可能である。以下では、主としてメチレンブルーを内標準としたフェナントロリン吸光光度法による  $\text{Fe}^{2+}$  の定量について述べる。

## 4.2 実験

### 4.2.1 分析システム

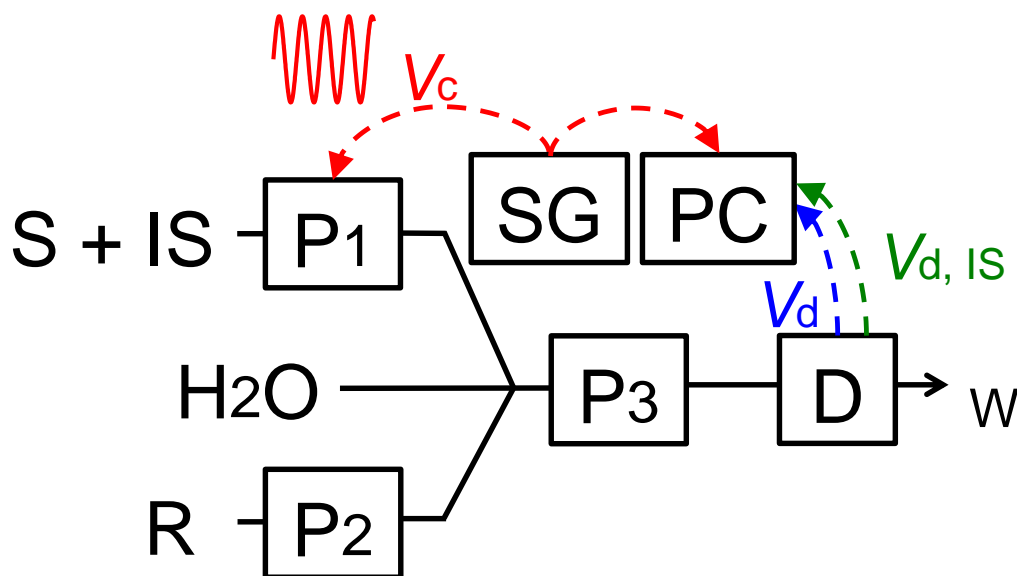


図 4.1 流路構成

基本的な流路構成を図 4.1 に示す。各デバイスは、特に述べるものを除き、第 3 章で述べたものと同じである。総流量一定のもと目的物質  $S$  と内標準  $IS$  を含む試料溶液を信号発生器  $SG$  からの交流波形制御信号  $V_c$  によって周期的に流動変動させながら送液し、一定流量で導入される試薬  $R$  と混合・反応を行ったのち、二波長紫外可視分光検出器  $D$ （ジューエルサイエンス，UV702 型）で目的成分に対する分析信号（ $V_d$ ）と内標準に対する分析信号（ $V_{d,IS}$ ）をそれぞれ測定する。両信号をデジタル変換してコンピュータ  $PC$  に取得し、高速フーリエ変換により、 $V_c$  の周波数に等しい周波数成分の振幅をそれぞれ求める。それぞれの振幅の比から目的成分の定量を行う。

本分析法においては、目的物質と内標準物質がそれぞれ独立した検出信号を与え、それぞれの分析波長においてお互いが分光干渉しないことが必須である。目的物質  $S$  と内標準物質  $IS$  は同じ溶液に含まれているので、制御信号  $V_c$  で流量変動をかけると両者の濃度情報は同じ周波数で振幅変調する。したがって、目的物質に対する振幅  $A_1$ （添字の 1 は基本波成分であることを意味する）と内標準物質に対する振幅  $A_{1,IS}$  の比  $A_1/A_{1,IS}$  をもとに定量を行えば、長時間測定の際に  $P_3$  や  $P_1$  の送液にゆらぎが生じてても、目的物質および内標準物質ともに等しくゆらぐため、そのゆらぎによる影響を補正することができる。



#### 4.2.2 試薬および試料

実験に使用した試薬は、ナカライテスク、関東化学、和光純薬工業から購入した特級あるいは分析用試薬であり、さらなる精製を行わず使用した。溶液の調製に用いた水は、逆浸透水をザルトリウス社製アリウム 611DI 型超純水製造装置を用いて精製したものである。 $\text{Fe}^{2+}$  標準溶液は、硫酸鉄(II)アンモニウム六水和物 ( $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) を酢酸塩緩衝液 (pH 4.6) (100 mL 中に酢酸ナトリウム 6.8 g および氷酢酸 2.88 g 含む) に溶解し調製した。 $\text{Fe}^{2+}$  の定量は、1,10-フェナントロリン吸光光度法[78-80]により行った。 $\text{Fe}^{2+}$  と 1,10-フェナントロリンから生成する赤色錯イオンを 510 nm で吸光光度測定した。呈色試薬である 1,10-フェナントロリン一水和物 ( $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) 溶液も同じ酢酸緩衝液に溶解し調製した。 $\text{Fe}^{2+}$  と 1,10-フェナントロリンによる 1 : 3 錯体は pH 2 - 9 範囲で一定かつ長時間安定した吸光度を示す。試薬と試料の液性を揃えることは、安定な錯体形成に加えて、各試薬の溶媒が異なる際に生じるシュリーレン現象 (屈折率効果) を防止するためにも有効である。

## 4.3 結果と考察

### 4.3.1 内標準物質の選択

4.2.1 節で述べたように内標準法の導入のためには、目的物質 S および内標準物質 IS それぞれの測定波長において、互いが分光干渉しないことが必要である。本章では詳細な結果は省略するが、本分析法の基礎的な検討を行うために使用した食用色素のエリスロシン B とタートラジンでは、それぞれの極大吸収波長（428 nm および 526 nm）において、この条件が満たされていた。Fe<sup>2+</sup>を目的物質とした実験では、有色金属イオン（Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>）や各種色素（メチレンブルー、ファストグリーン、ブリリアントブルー、インジゴカルミン、アシッドレッド）の吸収スペクトルを検討した結果、メチレンブルーを内標準物質として選択した。図 4.2 および 4.3 は、測定波長 300-900 nm における 35.8 μmol dm<sup>-3</sup> Fe<sup>2+</sup>・1,10-フェナントロリン錯体および 5 μmol dm<sup>-3</sup> メチレンブルーの連続スペクトルである。Fe<sup>2+</sup>・1,10-フェナントロリン錯体およびメチレンブルーの極大吸収波長はそれぞれ 510nm, 664 nm であり、互いの極大吸収波長において分光干渉は見られないことがわかる。また、メチレンブルーは、本研究で用いた濃度レベルでは Fe<sup>2+</sup>の呈色に影響（すなわち化学干渉）を与えなかった。

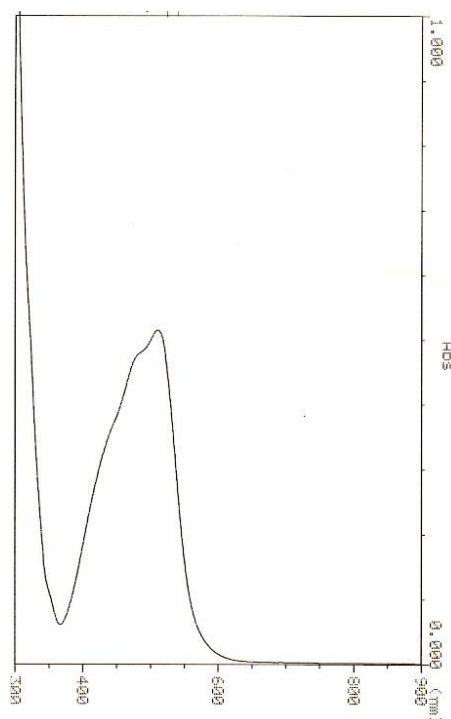


図 4.2 Fe<sup>2+</sup>反応生成物の連続スペクトル

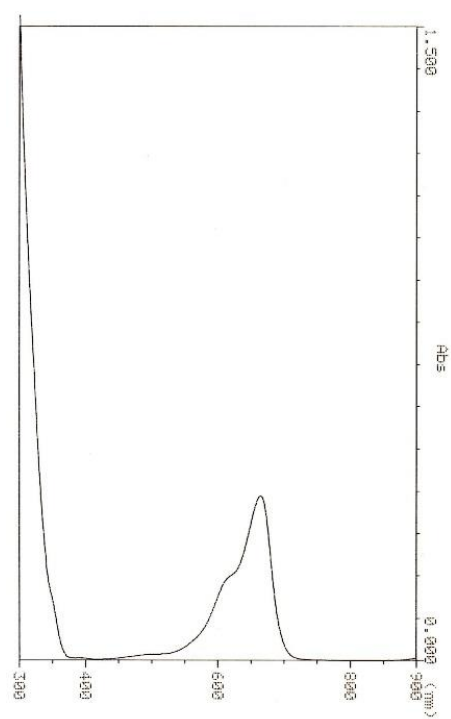


図 4.3 メチレンブルーの連続スペクトル

### 4.3.2 フェナントロリン吸光光度法による鉄 ( $\text{Fe}^{2+}$ ) の定量

内標準として  $10 \mu\text{mol dm}^{-3}$  のメチレンブルーを含む  $0.0 - 143.2 \mu\text{mol dm}^{-3}$  の  $\text{Fe}^{2+}$  溶液を試料溶液とした。これを周期 20 s で、最大流量が  $0.45 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ 、最小流量が  $0 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$  となるように送液した。1,10-フェナントロリン溶液を  $0.5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$  の一定流量で送液した。総流量は  $1.0 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$  とした。分析波長は 510 nm および 664 nm（それぞれ  $\text{Fe}^{2+} \cdot 1,10$ -フェナントロリン錯体およびメチレンブルーの極大吸収波長）である。

図 4.4 は、検出信号の一例であり、 $\text{Fe}^{2+}$  濃度が  $71.6 \mu\text{mol dm}^{-3}$  の場合の結果を示す。 $V_d$  は 510 nm における吸光度、 $V_{d,IS}$  は 664 nm における吸光度であり、それぞれ  $\text{Fe}^{2+} \cdot 1,10$ -フェナントロリン錯体およびメチレンブルーの濃度に対応している。図 4.5 は、 $V_d$  および  $V_{d,IS}$  の振幅の比  $A_{\text{Fe}^{2+}}/A_{\text{MB}}$  を  $\text{Fe}^{2+}$  濃度に対してプロットしたものである。直線性は良好であり ( $r^2 = 0.9970$ )、その回帰直線は、 $A_{\text{Fe}^{2+}}/A_{\text{MB}} = 0.0135 C_{\text{Fe}^{2+}} + 0.0672$  と求められた。検出限界 ( $3.3\sigma$ ) は  $14.9 \mu\text{mol dm}^{-3}$  と得られ、 $35.8 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{ Fe}^{2+}$  における繰り返し性は  $\text{RSD} = 1.00\%$  であった。

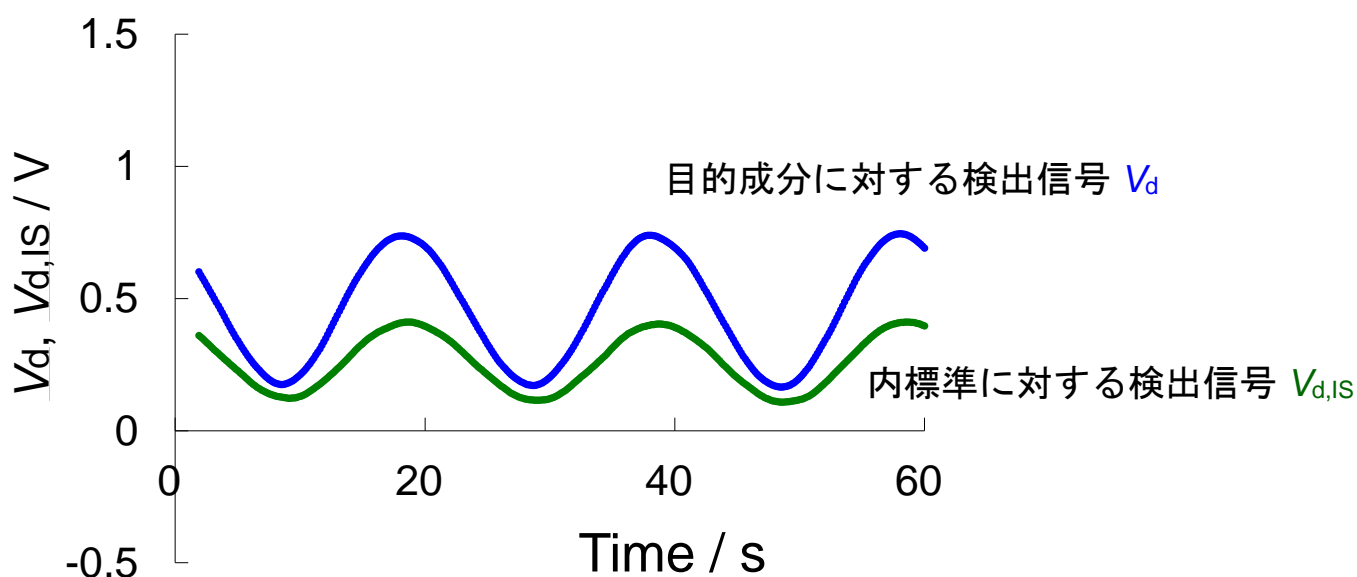


図 4.4 検出信号の一例

目的物質:  $71.6 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{ Fe}^{2+}$     内標準:  $10 \mu\text{mol dm}^{-3}$  メチレンブルー

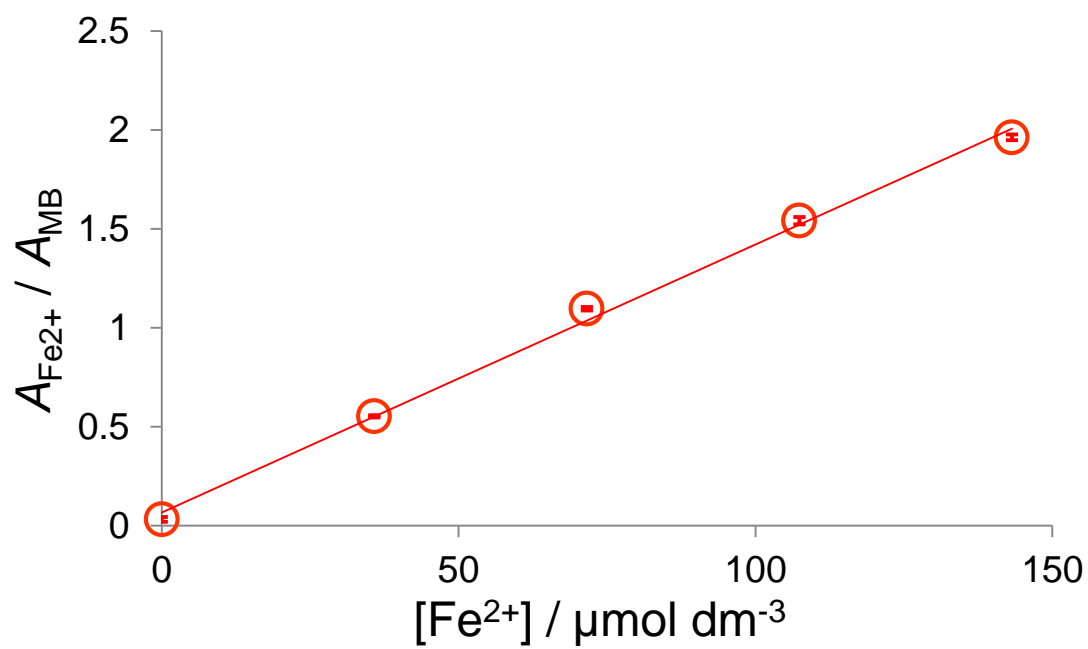


図 4.5  $\text{Fe}^{2+}$ 濃度と  $\text{Fe}^{2+} \cdot 1,10$ -フェナントロリン錯体/メチレンブルーの振幅比との関係

### 4.3.3 試料流量のゆらぎに対する頑健性

内標準として  $10 \mu\text{mol dm}^{-3}$  のメチレンブルーを含む  $107.4 \mu\text{mol dm}^{-3}$  の  $\text{Fe}^{2+}$  溶液を試料溶液とした。試料流量がゆらいだ場合を想定して、意図的に  $\text{P}_1$  ポンプの流量をゆらがせた。周期  $20 \text{ s}$  で正常時、流量が  $0 - 0.45 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$  となるように送液した。また、流量 11% 増大時、 $0 - 0.50 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ 、流量 11% 減少時、 $0 - 0.40 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$  となるよう送液した。他の実験条件は 4.3.2 節と同じである。結果を表 4.1 に示す。流量のゆらぎに応じて、 $\text{Fe}^{2+}$ ・フェナントロリン錯体およびメチレンブルーの検出信号の振幅  $A_{\text{Fe}^{2+}}$  および  $A_{\text{MB}}$  は、6.5 - 7.6% 変動している。これに対し、振幅の比  $A_{\text{Fe}^{2+}}/A_{\text{MB}}$  は、誤差 0.6% 以内と一定の値を示した。このことから、内標準を導入した振幅変調フロー分析法の頑健性が示された。

表 4.1 試料流量のゆらぎの影響

$\text{P}_1$ 流量 / $\text{cm}^3 \text{ min}^{-1}$	$A_{\text{Fe}^{2+}} / \text{V}$	$A_{\text{MB}} / \text{V}$	$A_{\text{Fe}^{2+}} / A_{\text{MB}}$
正常時 $0 - 0.45$	$0.1654 \pm 0.0014$	$0.0909 \pm 0.0010$	$1.8198 \pm 0.0098$
11%増大 $0 - 0.5$	$0.1537 \pm 0.0008$	$0.0850 \pm 0.0004$	$1.8092 \pm 0.0087$
11%減少 $0 - 0.4$	$0.1781 \pm 0.0015$	$0.0978 \pm 0.0011$	$1.8202 \pm 0.0086$

## 第5章 総括

本研究では、新規フロー分析法である振幅変調多重化フロー分析法のさらなる発展を目的として、振幅変調・ロックイン検出フロー分析法および気節・非相分離振幅変調多重化フロー分析法という新たなアプローチを提案し、リン酸イオンの定量へと応用した。

第1章では、振幅変調多重化フロー分析法の原理・特徴と目的物質であるリンについて概説した。

第2章では、リンの呈色反応として反応時間が短く高感度であるマラカイトグリーン法を、周波数解析法としてロックイン検出法を用いて検討した。信号発生器、流量可変ポンプ、紫外可視分光検出器、ロックインアンプ、コンピュータなどで構成されるシステムを構築した。総流量一定のもと、交流波形制御信号によって流量を変動させた試料を呈色試薬と合流させ、反応生成物の吸光度を下流で測定した。検出信号をロックインアンプに導き、制御信号に対応する周波数成分の振幅を求め、この振幅よりリン酸イオンの定量を行った。分析条件を最適化したシステムで得られた検量線の直線性は良好 ( $r^2 > 0.998$ ) で、検出限界 (3.3 $\sigma$ ) は  $0.17 \mu\text{mol dm}^{-3}$  であった。吸光度の振幅を基に測定を行う本法で、吸光度の値そのものより定量を行う従来法とは異なり、ベースライン変動の影響をほとんど受けないことが明らかになった。

第3章では、周波数解析法として高速フーリエ変換を用いることにより、多試料同時分析へと発展させた。フロー系内での管軸方向への分散による振幅減衰（感度の低下）を抑制するため、気泡によって液の流れを分節し、分散を各液節内に制限する気節法を検討した。物理的脱気を行わず、気液両相とも検出器へと導き、信号処理（取得した検出信号の傾きと変位をもとに判定）によって気泡由来信号を除去する方法を考案した。得られた液相信号を移動平均処理によって平滑化したのち、高速フーリエ変換で解析し、各制御周期に対応する周波数成分の振幅から2試料中の同時分析を行った。この気節・非相分離 AMMFA システムの制御、計測、解析、表示を自動化するために Excel VBA プログラムを作成した。メチルオレンジ水溶液を試料としてシステムおよびプログラムの検証と分析条件の最適化を行ったのち、水試料中のリン酸イオンの定量へと応用した。その結果、本法は、気節を導入しない AMMFA の場合の 1.46 - 1.66 倍の感度を得ることができ、検量線の直線性は良好 ( $r^2 > 0.999$ ) であり、検出限界 (3.3 $\sigma$ ) は  $0.75 \mu\text{mol dm}^{-3}$  以下であった。本法を河川水等の実試料の分析に応用し、良好な結果を得た。

第4章では、振幅変調フロー分析法による長時間連続測定の際の流量のゆらぎに対する頑健性を向上させるため、内標準法を導入した振幅変調フロー分析法も提案した。

# 謝辞

本研究の遂行において一貫してご指導を頂いた，徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部薬品分析学分野の田中秀治教授および竹内政樹准教授に深く感謝いたします。実験に協力いただいた徳島大学大学院薬科学教育部薬品分析学分野の上村剛史氏，徳島大学薬学部薬品分析学研究室の内本勝也氏に感謝いたします。また，有益な助言，激励の言葉を頂いた，徳島大学薬学部薬品分析学研究室の諸氏にお礼申し上げます。

## 参考文献

- [1] L.T. Skeggs, *Am. J. Clin. Pathol.* **28** (1957) 311-322.
- [2] L.T. Skeggs, *Anal. Chem.* **38** (1966) 31A-44A.
- [3] J. Ruzicka, E.H. Hansen, *Anal. Chim. Acta* **78** (1975) 145-157.
- [4] J. Ruzicka, G.D. Marshall, *Anal. Chim. Acta* **237** (1990) 329-343.
- [5] J. Ruzicka, A. Ivaska, *Anal. Chem.* **69** (1997) 5024-5030.
- [6] J. Ruzicka, *Analyst* **125** (2000) 1053-1060.
- [7] M. Miró, V. Cerdà, J.M. Estela, *Trends Anal. Chem.* **21** (2002) 199-210.
- [8] L. Ferrer, G. de Armas, M. Miró, J.M. Estela, V. Cerdà, *Talanta* **64** (2004) 1119-1126.
- [9] J.L.F.C. Lima, J.L.M. Santos, A.C.B. Dias, M.F.T. Ribeiro, E.A.G. Zagatto, *Talanta* **64** (2004) 1091-1098.
- [10] 城市康隆, N. Lenghor, 高柳俊夫, 大島光子, 本水昌二, *分析化学* **55** (2006) 707-713.
- [11] H. Itabashi, H. Kawamoto, T. Kawashima, *Anal. Sci.* **17** (2001) 229-231.
- [12] H. Tanaka, P.K. Dasgupta, J. Huang, *Anal. Chem.* **76** (2000) 4713-4720.
- [13] J. Burguera, “*Flow Injection Atomic Spectroscopy*”, 1989, Marcel Dekker, New York.
- [14] J. Ruzicka, E.H. Hansen, (石橋信彦, 与座範政 訳), 『フローインジェクション分析法』, 1983, 化学同人, 京都.
- [15] M. Valcarcel, M.D. Luque de Castro, “*Flow Injection Analysis*”, 1987, Ellis Horwood Ltd., Chichester.
- [16] J. Ruzicka, E.H. Hansen, “*Flow Injection Analysis, 2nd ed.*”, 1988, John Wiley & Sons, New York, Brisbane, Toronto, Singapore.
- [17] M. Trojanowicz, “*Flow Injection Analysis, Instrumentation and Applications*”, 2000, World Scientific Publishing, Singapore.
- [18] M. Trojanowicz (Ed.), “*Advances in Flow Analysis*”, 2008, Wiley-VCH, Weinheim.
- [19] S.D. Kolev, I.D. McKeivie, “*Advances in Flow Injection Analysis and Related Techniques, Volume 54 (Comprehensive Analytical Chemistry)*”, 2008, Elsevier, Amsterdam.
- [20] A. Cerdà, V. Cerdà, “*An introduction to flow analysis*”, 2009, Sciware, S.L., Palma de Mallorca.
- [21] 小熊幸一, 本水昌二, 酒井忠雄編, 『役にたつフローインジェクション分析』, 2009, みみずく舎, 東京.
- [22] 本水昌二, 小熊幸一, 酒井忠雄, 『フローインジェクション分析』, 2014, 共立出版, 東京.
- [23] J. Kozak, N. Jodłowska, M. Kozak, P. Kościelniak, *Anal. Chim. Acta* **702** (2011) 213-217.



- [24] U. Injang, P. Noyrod, W. Siangproh, W. Dungchai, S. Motomizu, O. Chailapakul, *Anal. Chim. Acta* **668** (2010) 54-60.
- [25] W. Siriangkhawut, K. Grudpan, J. Jakmunee, *Talanta* **84** (2011) 1366-1373.
- [26] W.-L. Cheng, J.-W. Sue, W.-C. Chen, J.-L. Chang, J.-M. Zen, *Anal. Chem.* **82** (2010) 1157-1161.
- [27] JIS K 0126, 『流れ分析通則』, 2009, 日本工業標準調査会, 東京.
- [28] JIS K 0170, 『流れ分析法による水質試験方法』, 2010, 日本工業標準調査会, 東京.
- [29] JIS K 0120, 『工業排水試験方法』, 2013, 日本工業標準調査会, 東京.
- [30] H. Tanaka, T. Mima, M. Takeuchi, H. Iida, *Talanta* **77** (2008) 576-580.
- [31] Y. Kurokawa, M. Takeuchi, H. Tanaka, *Anal. Sci.* **26** (2010) 791-796.
- [32] K. Inui, T. Uemura, T. Ogusu, M. Takeuchi, H. Tanaka, *Anal. Sci.* **27** (2011) 305-308.
- [33] H. Yoshida, K. Inui, M. Takeuchi, H. Tanaka, *Anal. Sci.* **26** (2012) 523-525.
- [34] P.H. Abelson, *Science* **283** (1999) 2015.
- [35] P.J. Worsfold, L.J. Gimbert, U. Mankasingh, O.N. Omaka, G. Hanrahan, P.C.F.C. Gardolinski, P.M. Haygarth, B.L. Turner, M.J. Keith-Roach, I.D. McKelvie, *Talanta* **66** (2005) 273-293.
- [36] J. Ma, D. Yuan, M. Zhang, Y. Liang, *Talanta* **78** (2009) 315-320.
- [37] B.E.R. Cordero, M.P. Cañizares-Macías, *Talanta* **78** (2009) 1069-1076.
- [38] S.V. Khlyntseva, A.B. Vishnikin, M.K.E.A. Al-Shwaiyat, H. Sklenářová, P. Solich, Y.R. Bazel, V. Andruch, *Talanta* **84** (2011) 1355-1360.
- [39] R.B.R. Mesquita, M.T.S.O.B. Ferreira, I.V. Tóth, A.A. Bordalo, I.D. McKelvie, A.O.S.S. Rangel, *Anal. Chim. Acta* **701** (2011) 15-22.
- [40] Z. Li, M. Oshima, A. Sabarudin, S. Motomizu, *Anal. Sci.* **21** (2005) 263-268.
- [41] C. Frank, F. Schroeder, R. Ebinghaus, W. Ruck, *Talanta* **70** (2006) 513-517.
- [42] M. Yaqoob, A. Nabi, P.J. Worsfold, *Anal. Chim. Acta* **510** (2004) 213-218.
- [43] Y. Liang, D. Yuan, Q. Li, Q. Lin, *Anal. Chim. Acta* **571** (2006) 184-190.
- [44] C.W. McLeod, I.G. Cook, P.J. Worsfold, J.E. Davies, J. Queay, *Spectrochim. Acta B: At. Spectr.* **40** (1985) 57-62.
- [45] R.D. Marco, C. Phan, *Talanta* **60** (2003) 1215-1221.
- [46] J. Jakmunee, J. Junsomboon, *Talanta* **79** (2009) 1076-1080.
- [47] J.M. Estela, V. Cerdà, *Talanta* **66** (2005) 307-331.
- [48] S. Motomizu, Z.-H. Li, *Talanta* **66** (2005) 332-340.
- [49] K. Itaya, M. Ui, *Clin. Chim. Acta* **14** (1966) 361-366.
- [50] American Public Health Association, “*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*”, 1992, American Public Health Association (APHA), Washington, D.C.
- [51] K. Higuchi, H. Tamanouchi, S. Motomizu, *Anal. Sci.* **14** (1998) 941-946.

- [52] JIS K 0101, 『工業用水試験方法』, 1998, 日本工業標準調査会, 東京.
- [53] A.J. Lyddy-Meaney, P.S. Ellis, P.J. Worsfold, E.C.V. Butler, I.D. Mckelvie, *Talanta* **58** (2002) 1043-1053.
- [54] S. Motomizu, T. Wakimoto, K. Toei, *Analyst* **108** (1983) 361-367.
- [55] S. Motomizu, T. Wakimoto, K. Toei, *Talanta* **30** (1983) 333-338.
- [56] A. Muñoz, F. Mas Torres, J.M. Estela, V. Cerdà, *Anal. Chim. Acta* **350** (1997) 21-29.
- [57] 多賀光彦, 那須淑子, 『地球の化学と環境』, p. 102, 1998, 三共出版, 東京, 日本.
- [58] L. Snyder, J. Levine, R. Stoy, A. Conetta, *Anal. Chem.* **48** (1976) 942A-956A.
- [59] L.R. Snyder, H.J. Alder, *Anal. Chem.* **48** (1976) 1017-1022.
- [60] L.R. Snyder, H.J. Alder, *Anal. Chem.* **48** (1976) 1022-1027.
- [61] C. Pasquini, W.A. de Oliveira, *Anal. Chem.* **57** (1985) 2575-2579.
- [62] C. Pasquini, *Anal. Chem.* **58** (1986) 2346-2348.
- [63] L.C. Tian, X.P. Sun, Y.Y. Xu, Z.L. Zhi, *Anal. Chim. Acta* **238** (1990) 183-190.
- [64] Y. Hsieh, S.R. Crouch, *Anal. Chem.* **303** (1995) 231-239.
- [65] Z.-L. Zhi, *Trends Anal. Chem.* **17** (1998) 411-417.
- [66] 中村尚五, 『ビギナーズ デジタルフーリエ変換』, pp. 147-152, 1989, 東京電機大学出版局, 東京.
- [67] R.L. Hagig, B.W. Schlein, L. Walters, R.E. Thiers, *Clin. Chem.* **15** (1969) 1045-1055.
- [68] W.E. Neeley, S. Wardlaw, M.E.T. Swinnen, *Clin. Chem.* **20** (1974) 78-80.
- [69] W.E. Neeley, S.C. Wardlaw, T. Yates, W.G. Hollingsworth, M.E.T. Swinnen, *Clin. Chem.* **22** (1976) 227-231.
- [70] W. Vogt, S.L. Braun, S. Wilhelm, H. Schwab, *Anal. Chem.* **54** (1982) 596-598.
- [71] C.J. Patton, M. Rabb, S.R. Crouch, *Anal. Chem.* **54** (1982) 1113-1118.
- [72] H. Liu, P.K. Dasgupta, *Anal. Chim. Acta* **288** (1994) 237-245.
- [73] H. Liu, P.K. Dasgupta, *Process Control Qual.* **7** (1995) 195-202.
- [74] 日本薬学会編, 『衛生試験法・注解』, pp. 875-877, 2010, 金原出版, 東京, 日本.
- [75] F.M. Pereira, D.M. Brum, F.G. Lepri, R.J. Cassella, *Microchem. J.* **117** (2014) 172-177.
- [76] M.A. Bechlin, F.M. Fortunato, E.C. Ferreira, J.A.G. Neto, J.A. Nóbrega, G.L. Donati, B.T. Jones, *Anal. Chim. Acta* **831** (2014) 24-30.
- [77] D.T. Gimenes, W.T.P. dos Santos, R.A.A. Munoz, E.M. Richter, *Electrochem. Commun.* **12** (2010) 216-218.
- [78] K. Hiroy, T. Tanaka, T. Sawada, *Bunseki Kagaku* **21** (1972) 635.
- [79] Y. Okura, *Bunseki Kagaku* **27** (1978) 477.
- [80] E.B. Sandell, “*Colorimetric Determination of Trace of Metals*, 3<sup>rd</sup> ed.”, 1959, Interscience, New York.